

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Aspectos Clínico-Laboratoriais, Perfil de Quimiocinas e Micropartículas Circulantes em Pacientes Portadores da Infecção Crônica pelo VHC Antes e Durante a Terapia Tripla

por

ISABELA GOMES RIBEIRO

BELO HORIZONTE

JUNHO/2015

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR I.G. RIBEIRO 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Aspectos Clínico-Laboratoriais, Perfil de Quimiocinas e Micropartículas Circulantes em Pacientes Portadores da Infecção Crônica pelo VHC Antes e Durante a Terapia Tripla

por:

ISABELA GOMES RIBEIRO

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração de Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientação: Dr^a. Andréa Teixeira Carvalho

Co-orientação: Dr^a Danielle Alves G. Zauli

BELO HORIZONTE

JUNHO/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R484a Ribeiro, Isabela Gomes.
2015

Aspectos clínicos-laboratoriais, perfil de quimiocinas e micropartículas circulantes em pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC antes e durante a terapia tripla / Isabela Gomes Ribeiro. – Belo Horizonte, 2015.

XVIII, 75 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 90 - 93

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infeciosas e Parasitárias.

1. Hepatite C/terapia 2. Vírus da Hepatite/patogenicidade
3. Biomarcadores Farmacológicos/análise I. Título. II. Carvalho, Andréa Teixeira (Orientação). III. Zauli, Danielle Alves Gomes (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.362 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Aspectos Clínico-Laboratoriais, Perfil de Quimiocinas e Micropartículas Circulantes em Pacientes Portadores da Infecção Crônica pelo VHC Antes e Durante a Terapia Tripla

por:

ISABELA GOMES RIBEIRO

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:
Prof. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho (Presidente)
Prof. Dra. Silvana Maria Elói Santos
Prof. Dra. Luciana Diniz Silva
Suplente: Marina de Moraes Mourão
Dissertação defendida e aprovada em: 26/06/2015

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou -Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores

Dr. Olindo Assis Martins Filho

Dr^a. Samanta Ribeiro Béla

Dr^a. Ana Carolina Campi Azevedo

Dr^a. Fernanda Magalhães Freire Campos

Me. Marcela de Lima Moreira

Jordana Rodrigues Barbosa Fradico

Thiago Bruno Fagundes Macedo

Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG.

Dr^a. Rosângela Teixeira

Geraldo Scarabelli

Arbovirus Section, Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration

Dr^a. Maria Rios

Dr^a. CarenChancey

SUPORTE FINANCEIRO

FIOCRUZ, CNPq e FAPEMIG

“De repente tudo vai ficando tão simples que assusta. A gente vai perdendo as necessidades, vai reduzindo a bagagem. As opiniões dos outros, são realmente dos outros, e mesmo que sejam sobre nós, não tem tanta importância. Vamos abrindo mão das certezas, pois já não temos certeza de nada. E isso não faz a menor falta. Paramos de julgar, pois já não existe certo ou errado e sim a vida que cada um escolheu experimentar. Por fim entendemos que tudo que importa é ter paz e sossego, é viver sem medo, é fazer o que alegra o coração naquele momento. E só”.

(desconheço o autor)

**Dedico este trabalho ao Romero que sempre esteve ao meu lado
e sempre estará em meu coração**

Agradecimentos

À Dr^a. Andréa Teixeira Carvalho agradeço pela oportunidade de aprendizado e confiança em meu trabalho, este trabalho pode ser caracterizado em AAT (Antes de Andréa Teixeira) e DAT (Depois de Andréa Teixeira), MUITO OBRIGADA pela paciência e dedicação ao meu aprendizado, parabéns por ser uma legítima cientista.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela gentileza em abrir as portas do GIPB me dando o privilégio de participar deste grupo.

À Dr^a. Rosângela Teixeira por todo o apoio profissional e agora amizade. Um exemplo de médica que exerce a medicina em sua mais nobre forma.

À Dr^a. Danielle Zauli pela co-orientação e ensinamentos.

Ao Geraldo Scarabelli por toda ajuda de sempre, muito obrigada.

À Jordana Fradico pela incansável ajuda e disponibilidade.

À Samantha Béla pela grande ajuda em momentos essenciais.

Ao Thiago Macedo pela ajuda e companhia em todos os momentos, do começo ao fim.

À Marcela pela grande participação nos experimentos e palavras encorajadoras.

À Carol Campi pela grande participação nas análises.

À Ludymila pela ajuda nos experimentos.

À Lorena pela ajuda nos experimentos.

À Jucélia pela ajuda.

Aos amigos do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores pela acolhida.

Aos pacientes do IAG- Instituto Alfa de Gastroenterologia e especialmente os que participaram deste trabalho, obrigada pelo aprendizado científico e humano pelos mais de 1 ano e meio de convívio.

Aos colegas do Ambulatório de Hepatites Virais pelo sempre trabalho com dedicação aos pacientes.

Ao Dr. Rodrigo Cambraia pelos ensinamentos.

À Dra. Luciana Diniz pelas palavras sempre acolhedoras.

À Raquel pela doce acolhida.

Aos colaboradores que tornaram este trabalho possível.

À FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz, ao CPqRR- Centro de Pesquisas René Rachou e Pós-Graduação que propiciaram o desenvolvimento deste projeto.

Às agências financiadoras.

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

À banca examinadora que contribuirá para a qualidade deste trabalho e meu desenvolvimento profissional.

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

À Rosângela Maria do Nascimento pessoa certa na hora certa.

Às minhas amigas Cecília, Juliane e Silvia pela amizade sincera.

Às minhas amigas do HMC, Simone, Sheila, Virgínia, Carol, Carla, Giovanna e Tati, pelo convívio e apoio.

Às minhas amigas do HMJFC Carolina, Renata, Daniela, Vanessa, Raquel e Reginara pelos maravilhosos anos de convívio e trabalho.

Ao Romero pelos maravilhosos 15 anos de relacionamento.

À Deus que me carregou nos momentos em que a caminhada foi dura.

À todas pessoas queridas que ainda passarão por minha vida.

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

À mim mesma que me mostrei que sou mais forte do que imaginava.

Sumário

Lista de figuras	XII
Lista de tabelas	XIII
Lista de gráficos	XIV
Lista de abreviaturas	XVI
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 <i>Objetivo geral</i>	22
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Caracterização da população avaliada	30
4.2 Procedimentos éticos	30
4.2.1 Critérios de inclusão	31
4.2.2 Critérios de exclusão	31
4.3 Obtenção das amostras biológicas	31
4.4 Obtenção de dados clínico-laboratoriais de rotina	32
4.5 Hemograma	32
4.6 Dosagem de enzimas hepáticas	32
4.7 Dosagens de quimiocinas	32
4.8 Quantificação dos níveis de micropartículas (MPs) no plasma dos pacientes	35
4.9 Análises estatísticas	36
5 RESULTADOS	37
5.1 <i>Tópico I: Aspectos clínico-laboratoriais, antes e durante o tratamento triplo</i>	38
5.2 <i>Tópico II: Perfil de quimiocinas circulantes antes e durante o tratamento triplo</i>	56
5.3 <i>Tópico III: Perfil de micropartículas circulantes antes e durante o tratamento triplo</i>	62
5.4 <i>Tópico IV: Perfil panorâmico de biomarcadores antes e durante o tratamento triplo</i>	72
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	82
8 ANEXOS	83
8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
9 REFERÊNCIAS	90

Lista de figuras

- Figura 01** - Estrutura viral do VHC 23
- Figura 02**- Representação esquemática da análise de quimiocinas, por meio do ensaio com microesferas fluorescentes por citometria de fluxo 34
- Figura 03**- Representação esquemática da análise de micropartículas em plasma livre de plaquetas de paciente portador da infecção crônica pelo vírus da hepatite C antes do tratamento 36
- Figura 04**- Rede de interações biológicas entre os biomarcadores avaliados em pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 75

Lista de tabelas

Tabela 01- Escore METAVIR para estadiamento da fibrose hepática	27
Tabela 02 - Escore de Child-Pugh	27
Tabela 03- Quimiocinas avaliadas durante o estudo com seus respectivos principais tipos celulares quimioatraentes	33
Tabela 04- Fenótipos utilizados para os marcadores celulares avaliados na população de micropartículas circulantes	35
Tabela 05- Dados demográficos, carga viral e genótipo viral de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC avaliados durante o estudo com tratamento triplo	39
Tabela 06- Provável modo de aquisição e tempo estimado de infecção pelo VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo	40
Tabela 07- Carga viral para VHC de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC durante o tratamento triplo	41
Tabela 08- Principais sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC durante o tratamento triplo	43
Tabela 09- Uso, tempo de uso e tempo de interrupção do uso de álcool por pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo	44
Tabela 10 - Uso, tempo de uso e tempo de interrupção do uso de tabaco por pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo	45
Tabela 11 - Número de tratamentos anteriores contra o vírus VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo	46
Tabela 12 - Motivos relatados da falha de tratamentos anteriores contra o vírus HCV pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo	47
Tabela 13- Resultado do tratamento triplo de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo	48

Lista de gráficos

Gráfico 01- Concentração de HEMOGLOBINA de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	49
Gráfico 02- Contagem GLOBAL DE LEUCÓCITOS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	50
Gráfico 03- Contagem do número absoluto de NEUTRÓFILOS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	51
Gráfico 04- Número absoluto de LINFÓCITOS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	52
Gráfico 05- Número absoluto de PLAQUETAS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	53
Gráfico 06- Níveis de ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	54
Gráfico 07- Níveis de ASPARATO AMINOTRANSFERASE (AST) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	55
Gráfico 08- Níveis circulantes de CCL2/MCP-1 provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	57
Gráfico 09- Níveis circulantes de CCL5/RANTES provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	58
Gráfico 10- Níveis circulantes de CXCL8/IL-8 provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	59
Gráfico 11- Níveis circulantes de CXCL9/MIG provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	60
Gráfico 12- Níveis circulantes de CXCL10/IP-10 provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	61
Gráfico 13- Percentual de micropartículas circulantes originadas de ERITRÓCITOS (CD235a ⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	63
Gráfico 14- Percentual de micropartículas circulantes originadas de CÉLULAS ENDOTELIAIS (CD51 ⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo	64
Gráfico 15- Percentual de micropartículas circulantes originadas de PLAQUETAS (CD41a ⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e	65

durante o tratamento triplo

- Gráfico 16-** Percentual de micropartículas circulantes originadas de LEUCÓCITOS CD45⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 66
- Gráfico 17-**Percentual de micropartículas circulantes originadas de NEUTRÓFILOS (CD66b⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 67
- Gráfico 18-** Percentual de micropartículas circulantes originadas de MONÓCITOS (CD14⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 68
- Gráfico 19-** Percentual de micropartículas circulantes originadas de LINFÓCITOS T (CD3⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 69
- Gráfico 20-** Percentual de micropartículas circulantes originadas de LINFÓCITOS T AUXILIARES (CD4⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 70
- Gráfico 21-** Percentual de micropartículas circulantes originadas de LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS/SUPRESSORES (CD8⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 71
- Gráfico 22 -** Análise do perfil panorâmico de biomarcadores de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo 73

Lista de abreviaturas

- ALT**-Alanina aminotransferase.
- AST**-Aspartatoaminotransferase.
- BOC**-Boceprevir.
- COEP**- Conselho de Ética em Pesquisa.
- ELISA**-*Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*- Ensaio imunoenzimático
- VHB**-Vírus da hepatite B.
- HC**- Hospital das Clínicas.
- VHC**-Vírus da hepatite C.
- HIV**-Vírus da imunodeficiência humana.
- IAG**- Instituto Alfa de Gastroenterologia.
- IL** -Interleucina.
- IP-10** -*Interferon-inducible protein-10* - proteína 10 induzida por interferon.
- MCP-1**-*Monocyte chemo attractant protein-1* - Proteína quimioatraente de monócitos 1.
- MIG** -*Monokine induced by interferon-gamma* – Monocina induzida por interferon-gama.
- MPs** - Micropartículas.
- PEG-IFN + RBV**-Interferon-alfa peguilado e ribavirina.
- PLP**- Plasma livre de plaquetas.
- PPP**- Plasma pobre em plaquetas.
- RANTES** -*Regulated up on activation normal T-cell expressed, and presumably secreted*- Fator regulado e secretado após ativação de células T.
- RIBA**-*Recombinant Immunoblot Assay*- Ensaio imunoblot recombinante.
- RV**- Resposta virológica.
- RVP**- Resposta virológica parcial.
- RVS**- Resposta virológica sustentada.
- SUS**-Sistema Único de Saúde.
- TCLE**- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- TELA**-Telaprevir.
- UFMG**- Universidade Federal de Minas Gerais.

Resumo

Diante de constantes avanços no entendimento da infecção pelo VHC e mudanças no esquema terapêutico, torna-se necessário uma melhor compreensão da cinética de biomarcadores imunológicos ao longo do tratamento triplo e a sua importância na monitoração terapêutica e no alcance da resposta virológica sustentada (RVS) pelos pacientes ao término do tratamento. Neste estudo foi realizada uma caracterização cinética dos aspectos clínico-laboratoriais, perfil de quimiocinas e micropartículas circulantes em pacientes com infecção crônica pelo VHC, antes e durante a terapia tripla com interferon peguilado, ribavirina e inibidor de protease (telaprevir ou boceprevir). Foram avaliados 20 pacientes infectados com o vírus VHC com genótipo 1 em tratamento com terapia tripla e 20 indivíduos saudáveis, doadores de sangue, que compuseram o grupo controle para o estabelecimento dos valores de referência para análise de quimiocinas e micropartículas (MPs) circulantes. As quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP10 e MPs derivadas de eritrócitos, células endoteliais, plaquetas, leucócitos e suas subpopulações foram quantificadas em soro e plasma, respectivamente, empregando citometria de fluxo, comparando os dados antes do tratamento (AT) e durante o tratamento (DT) nas semanas 2, 4, 8, 12, 24 e 48. Nossos resultados demonstraram que 70,0% dos pacientes eram do sexo masculino e 35,0% do sexo feminino, com idade média de 58,5 anos. Dos vinte pacientes avaliados 75,0% apresentavam o genótipo 1b e 30,0% o genótipo 1a do VHC. Quatorze pacientes completaram o tratamento triplo com 86,7% de RVS. Na análise de quimiocinas, houve um aumento de CCL2 na semana 12 em comparação com AT. CXCL8 aumentou na semana 12 em comparação com AT. CXCL9 e CXCL10 diminuíram na semana 24 em relação à semana 12 DT. Na análise da frequência de MPs, aquelas originadas de neutrófilos diminuíram nas semanas 2 e 24, em comparação com a AT, diminuíram na semana 24 em comparação com a semana 8 DT e aumentaram na semana 8 em relação à semana 2 DT. As micropartículas derivadas de monócitos diminuíram nas semanas 2, 12 e 24 em comparação com AT e aumentaram na semana 48 em relação à semana 24. As MPs derivadas de linfócitos TCD3⁺ diminuíram nas semanas 12, 24 e 48 em comparação com AT e nas semanas 24 e 48 em relação à semana 4 DT. Já aquelas originadas de linfócitos TCD4⁺ diminuíram nas semanas 12 e 24 em comparação com AT e diminuíram na semana 12 em comparação com a semana 4 DT. Avaliações adicionais que utilizaram ferramentas de análise de sistemas biológicos revelaram que antes do tratamento houve uma elevação de enzimas hepáticas e frequências das MPs nos pacientes, e a frequência de altos produtores de quimiocinas foi baixa. Após o tratamento, houve uma diminuição progressiva das enzimas hepáticas e micropartículas, que foi acompanhado por aumento de quimiocinas com um pico na semana 12 do tratamento. Na semana 24 do tratamento, houve uma redução na maioria dos biomarcadores em comparação com a frequência mostrada antes do tratamento, exceto para CCL2 e CCL5 que ainda estavam sendo secretadas ao final do tratamento. Em suma, as análises do presente estudo mostraram que houve um declínio dos marcadores de agressão hepática, dos níveis de quimiocinas e da frequência de micropartículas no decorrer do tratamento, sugerindo, em síntese, que o tratamento e a redução ou eliminação do VHC promove um ambiente imunomodulador com retorno da resposta imunológica dentro dos padrões esperados na ausência da infecção viral. Para grande maioria dos pacientes que terminaram o tratamento, esse panorama está associado ao alcance de resposta virológica sustentada e, conseqüentemente, ao sucesso do tratamento triplo.

Abstract

Faced with constant advances in the understanding of HCV infection and changes in the therapeutic regimen, it becomes necessary a better understanding of the kinetics of immune biomarkers along the triple treatment, and its importance in therapeutic monitoring and scope of sustained virologic response (SVR) by patients after treatment. In this study it was performed a kinetic characterization of clinical and laboratory aspects, chemokines profile and circulating microparticles in patients with chronic HCV infection before and during triple therapy with pegylated interferon, ribavirin and protease inhibitor (telaprevir or boceprevir). 20 patients infected with genotype 1 HCV virus treated with triple therapy and 20 healthy blood donors, who comprised the control group for the establishment of benchmarks for analysis of circulating chemokines and microparticles (MPs), were assessed. The CCL2 / MCP-1, CCL5 / RANTES, CXCL8 / IL-8, CXCL9 / MIG and CXCL10 / IP10 chemokines and MPs derived from erythrocyte, endothelial cells, platelets, leukocytes and their subpopulations were quantified in serum and plasma, respectively, using flow cytometry, comparing the data before treatment (BT) and during treatment (DT) at weeks 2, 4, 8, 12, 24 and 48. Our results showed that 70.0% of patients were male and 35.0% female, mean age of 58.5 years. Of the twenty patients evaluated, 75.0% had genotype 1b and 30.0% had genotype 1a of HCV. Fourteen patients completed triple therapy with 86.7% of RVS. In the analysis of chemokines, there was an increase of CCL2 at week 12 compared to BT. CXCL8 increased at week 12 compared to BT. CXCL9 and CXCL10 decreased at week 24 compared to week 12 DT. In MPs frequency analysis, those originating from neutrophils decreased at weeks 2 and 24, compared with BT, decreased at week 24 compared to week 8 DT and increased at week 8 compared to week 2 DT. The microparticles derived from monocytes decreased at weeks 2, 12 and 24 compared with BT and increased at week 48 compared to week 24. The MPs derived TCD3 + lymphocytes decreased on days 12, 24 and 48 compared to BT and at weeks 24 and 48 compared to week 4 DT. The ones originating from CD4 + T lymphocytes, decreased at weeks 12 and 24 compared to BT and decreased at week 12 compared to week 4 DT. Additional assessments that used biological systems analysis tools revealed that before treatment there was an elevation of liver enzymes and frequencies of MPs in patients, and the frequency of high producers of chemokines was low. After treatment, there was a progressive decrease in liver enzymes and microparticles, which was accompanied by increase of chemokines with a peak at week 12 of treatment. At week 24 of treatment there was a reduction in most of the biomarkers compared with the frequency shown before treatment, except for CCL2 and CCL5 which were still secreted the end of treatment. In short, the analysis of this study showed that there was a decline of liver injury markers and of the levels of chemokines and microparticles frequency during treatment, suggesting, in essence, that the treatment and the reduction or elimination of HCV promotes immunomodulator environment with return of immune response within the standards expected in the absence of viral infection. For the vast majority of patients who completed treatment, this situation is associated with sustained virologic response range and, consequently, the success of triple therapy.

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus hepatotrópico, não-citopático, que consiste em uma poliproteína constituída por proteínas estruturais (proteína do *core* e proteínas 1 e 2 do envelope), proteínas não-estruturais (NS2 a NS5), e uma proteína de função desconhecida (p7) (LAUER & WALKER, 2001). Sua alta capacidade de mutação resultando em numerosas sequências e quasiespécies contribui para a evasão da resposta imune do hospedeiro e cronicidade da infecção. Somado a isso, o vírus possui alta taxa de replicação de 10^{12} partículas virais por dia. Por consequência, origina-se uma população com alta variabilidade genética e com muitas mutações que podem diferir em diversas combinações dentro da população. As quasiespécies são importantes na história natural da infecção, pois esta diversidade provavelmente está relacionada ao mecanismo de escape do vírus ao sistema imunológico do hospedeiro. Sendo assim, existem 7 genótipos de VHC e mais de 80 subtipos dentro destes genótipos.

Os estudos de prevalência da hepatite C são escassos e possuem grande variação. Estima-se uma prevalência média global da hepatite C próxima de 3% (variando entre 0,1 a 5% em diferentes países). Somam-se, portanto, mais de 170 milhões de portadores do vírus C em todo o mundo (BISCEGLIE, 1998; Craxi *et al*, 2011; HOOFNAGLE, 1999; CHENEY *et al*, 2000).

Com base em dados de doadores de sangue, a prevalência da hepatite C possui índice inferior a 1% em países como Reino Unido, Escandinávia, Nova Zelândia em algumas áreas do Japão, ou com índice de até 26% no Egito (BRASIL, 2012).

A prevalência no Brasil também com base em doadores de sangue é de 0,62% na região Norte, 0,55% na região Nordeste, 0,43% no Sudeste, 0,28% na região Centro Oeste e 0,46% na região Sul (BRASIL, 2012).

A transmissão do vírus ocorre principalmente por via parenteral, sendo que existem populações consideradas de alto risco: indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993, pessoas que compartilham material para uso de drogas injetáveis, que possuam tatuagem e/ou *piercing* ou que apresentem outras formas de exposição percutânea. A transmissão de hepatite C por via sexual não é descartada, ocorrendo principalmente em pessoas com múltiplos parceiros e que não utilizam preservativo (LAUER & WALKER, 2001). Já a transmissão perinatal é possível e ocorre quase sempre no momento do parto ou logo após, e a transmissão intrauterina é incomum. Apesar da possibilidade da transmissão através do aleitamento materno, uma vez que partículas virais foram demonstradas no colostro e leite materno, não há até agora evidências conclusivas de aumento

do risco à transmissão, exceto na ocorrência de fissuras ou sangramento nos mamilos. A transmissão pode estar associada ao genótipo e carga viral do VHC (BRASIL, 2005).

A infecção pelo VHC se apresenta de duas formas principais: infecções assintomáticas ou sintomáticas. As hepatites sintomáticas são caracterizadas por mal-estar, cefaléia, febre baixa, anorexia, astenia, fadiga, artralgia, náuseas, vômitos, desconforto no hipocôndrio direito, aversão a alguns alimentos e cigarro. A icterícia é encontrada entre 18 a 26% dos casos e inicia-se quando a febre desaparece, podendo ser precedida por colúria e hipocolia fecal (BRASIL, 2012). As formas crônicas são observadas em 70 a 80% dos indivíduos que adquirem esta infecção (BRASIL, 2012).

Peculiaridades do quadro infeccioso, como o genótipo e a carga viral do VHC, do hospedeiro, como idade à infecção, sexo e resposta imune, assim como a concomitância de outros fatores de agressão hepática, como o alcoolismo e as coinfeções com o vírus da hepatite B (VHB) ou da imunodeficiência humana (HIV), parecem interferir no curso da doença (DI BISCEGLIE *et al.*, 1991). Contudo, as interações entre o VHC e o sistema imune do hospedeiro parecem ser determinantes para a história natural da infecção pelo VHC (REHERMANN, 2000). Assim, há evidências contundentes de que uma resposta imune vigorosa é necessária para o clareamento viral espontâneo, isto é, o desaparecimento do vírus, (REHERMANN *et al.*, 2005; COOPER *et al.*, 1999). De fato, sabe-se que o VHC não tem ação citopática direta sobre os hepatócitos. Assim, a resposta imune ao vírus parece ser a verdadeira responsável pelas lesões hepáticas. Contudo, a escassez de modelos animais e/ou sistemas de cultura celular adequados para estudos sobre a resposta imune na infecção pelo VHC dificultam o conhecimento preciso dos componentes dessa resposta (THIO, 2008).

O portfólio de medicamentos para tratamento contra a hepatite C vem aumentando progressivamente. O interferon-alfa convencional apresentava taxa de resposta virológica sustentada-RVS, de 6% a 16%, a sua associação com ribavirina demonstrou taxa de 34% a 42%. O interferon-alfapeguilado apresentava 39% de RVS, o interferon-alfa peguilado associado à ribavirina conferiu resposta virológica sustentada em 60% dos casos. A partir de 2011, com a inclusão dos inibidores de protease, telaprevir e boceprevir, alcançou-se até 80% de RVS. O cenário atual nos apresenta resultados de resposta virológica sustentada superior a 90% com o uso de uma segunda geração de inibidores de protease, simeprevir e sofosbuvir, utilizados nos Estados Unidos da América e Europa (Yong Huo, *et al.* 2015; VO, KP, *et al.*, 2015; MANZANO-ROBLEDA Mdel C, 2015; BRASIL, 2005).

No Brasil, o tratamento atual com inibidores de protease telaprevir e boceprevir foi aprovado em 2013 para os pacientes monoinfectados pelo genótipo 1 do VHC e com fibrose avançada (Metavir F3 e F4) ou cirrose hepática compensada (Child-Pugh \leq 6) (BRASIL,

2012). O tratamento atual é composto por interferon-alfa peguilhado, ribavirina e telaprevir ou boceprevir é denominado de tratamento triplo. Variações entre indivíduos interferem no sucesso do tratamento e a resposta imune é um dos elementos que podem atuar de forma decisiva para a obtenção da RVS.

O presente estudo pretendeu caracterizar aspectos clínico-laboratoriais, perfil de quimiocinas e micropartículas circulantes em pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC antes e durante tratamento triplo. A nossa hipótese é que os parâmetros avaliados apresentarão perfis distintos antes e durante o tratamento triplo e também apresentarão cinéticas distintas ao longo do tratamento. A maioria dos pacientes em uso de terapia tripla alcançará RVS que estará associada à imunodulação dos mecanismos imunológicos induzidos pela infecção viral.

Diante de constantes avanços no entendimento da infecção pelo VHC e mudanças no esquema terapêutico, torna-se necessário uma melhor compreensão da cinética de biomarcadores imunológicos ao longo do tratamento triplo e a sua importância na monitoração terapêutica e no alcance da RVS pelos pacientes ao término da terapia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar aspectos clínico-laboratoriais, perfil de quimiocinas e micropartículas circulantes em pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC, antes e durante tratamento triplo (interferon-alfa peguilado, ribavirina e telaprevir ou boceprevir).

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil clínico-laboratorial de pacientes VHC positivos, antes e durante o tratamento triplo;
- Determinar os níveis séricos de quimiocinas de pacientes VHC positivos, antes e durante o tratamento triplo;
- Caracterizar o perfil de micropartículas eritrocíticas, endoteliais, plaquetárias e leucocitárias circulantes no plasma de pacientes portadores de VHC, antes e durante o tratamento triplo;
- Correlacionar os parâmetros avaliados entre si, empregando estratégias de análise de sistemas biológicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O VHC, vírus RNA da família *Flaviviridae* conhecido inicialmente como hepatite não-A não-B, foi isolado em 1989 por CHOO, Q. L. *et al.* Os mesmos descobridores deste vírus também fizeram o sequenciamento do seu genoma. O tamanho do vírus varia de 30 a 80nm, possui um envelope lipídico contendo RNA de fita simples no seu interior, uma cadeia com mais de 9000 nucleotídeos, sua região estrutural possui 191 aminoácidos contendo também o core, responsável pela codificação das proteínas p22 que atuam na formação de nucleocapsídeos internos que envolvem o genoma. A região estrutural E1 possui 192 aminoácidos e a E2 possui 367 aminoácidos que são responsáveis pela codificação das glicoproteínas GP33 e GP70 que formam o envelope lipídico e seis regiões não-estruturais na região carboxi-terminal NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b, que são responsáveis pela replicação viral. A Figura 01 mostra a representação esquemática do VHC.

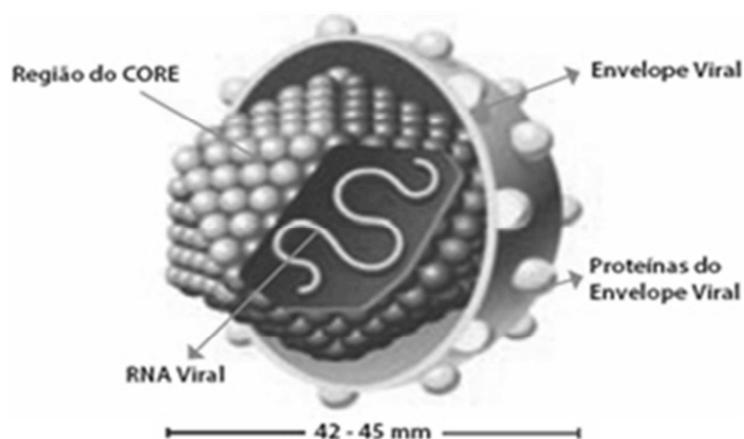


Figura 01-Estrutura viral do VHC. Fonte: <http://www.niv.com.br>.

A classificação do VHC se dá em seis genótipos numerados de 1 a 7. No Brasil, os genótipos mais frequentes são o genótipo 1 e 3 (OLIVEIRA *et al.* 1999; BUSEK & OLIVEIRA, 2003). A genotipagem viral é desnecessária para o diagnóstico, mas ajuda a prever o resultado da terapia e influencia na escolha do regime terapêutico (OLIVEIRA *et al.* 1999; BUSEK & OLIVEIRA, 2003). Para os genótipos 2 e 3, por exemplo, a dose da medicação e o tempo de tratamento são menores do que os recomendados para o genótipo 1. Diferentes métodos estão disponíveis para a determinação do genótipo do VHC, a maioria é baseada em amplificação do material genético específico pelo ensaio de PCR e suas variações (GHANY *et al.*, 2009).

A transmissão do VHC ocorre pelo contato com sangue infectado e pode ocorrer por exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados, transplante de doadores infectados, compartilhamento de materiais para uso de drogas, confecção de tatuagens e colocação de *piercing* ou compartilhamento de objetos pessoais como lâminas de barbear ou material para depilação, escovas de dente e materiais utilizados por manicures. A forma de transmissão por exposição de mucosas a fluidos corporais é menos expressiva (Brasil, 2005).

Pessoas com privação de liberdade e moradores de rua apresentam taxa de prevalência aumentada quando comparada à prevalência geral. Carvalho e colaboradores no ano de 1996, em estudo realizado no Estado de São Paulo com usuários de drogas injetáveis, encontraram uma frequência de 75% para VHC. Em estudo na cidade de São Paulo, Brito e colaboradores em 2007 encontraram uma prevalência para VHC de 8,5% em moradores de rua, sendo destes, 50% usuários de drogas e 17,1% com passagem anterior pelo sistema prisional. Cabe aos profissionais de saúde um olhar atento aos grupos que possuem taxas expressivamente maiores do que na população geral, fazendo rastreamento para VHC quando em contato com estes indivíduos. A orientação para a prevenção da transmissão do VHC deve ser realizada ao maior número de pessoas, focando-se no aconselhamento para atitudes e práticas seguras como o uso de preservativo, não compartilhamento de instrumentos e materiais como escovas de dente, materiais de manicure e pedicure, barbeadores e depiladores.

Apesar dos hepatócitos serem o alvo principal do VHC, o vírus pode também interagir com outros tipos celulares, tais como monócitos, linfócitos, células endoteliais, eritrócitos e plaquetas. Essas interações podem afetar a disponibilidade do vírus circulante e influenciar a patogênese da infecção e a resposta do hospedeiro frente à terapia antiviral (DUSTIN *et al.*, 2007). Nesse contexto, uma característica de muitas doenças inflamatórias e infecciosas é a ativação de células sanguíneas e do sistema vascular. Esta ativação leva a um processo de vesiculação, formando as micropartículas (MPs), que são fragmentos da membrana plasmática de algumas células, formados em condições fisiológicas ou quando a homeostase do tecido é perturbada (MAUSE; VEBER, 2010). As MPs formam uma população heterogênea, mas em geral, são definidas pelo seu tamanho (menor que 1 micrômetro) e pela presença de resíduos de fosfatidilserina (PS) em sua superfície externa (COUPER *et al.*, 2010). As MPs possuem diferentes características de acordo com as células que as originam, ou seja, quando as MPs são formadas, elas se deslocam, levando consigo as proteínas de membrana da sua célula de origem (VAN DER HEYDE *et al.*, 2011). As mais comuns são derivadas de plaquetas (GEORGE *et al.*, 2011), mas existem também as que se originam de eritrócitos (SCOTT, PENDLEBURY and GREEN, 1984) leucócitos (SATTA *et al.*, 1994) e células endoteliais (COMBES *et al.*, 2005). As MPs têm um importante papel na inflamação,

coagulação e homeostase vascular, possuindo várias funções fisiológicas, incluindo o transporte de componentes da membrana da célula de origem para outras células, ativando direta ou indiretamente a inflamação e a coagulação. Uma grande variedade de condições clínicas geram MPs, como doenças cardiovasculares, câncer, coagulopatias (JY *et al.*, 1992) e talassemias (PATTANAPANYASAT *et al.*, 2004; PATTANAPANYASAT *et al.*, 2007). Embora muitos aspectos da função de MPs ainda sejam desconhecidos, existem evidências crescentes que elas são fundamentais nos processos inflamatórios e de coagulação. (ROZMYSLOWICZET *et al.*, 2003).

As MPs já foram descritas como importante marcador correlacionado com processos inflamatórios, após a ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ durante a infecção pelo VHC, sendo também correlacionadas positivamente aos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (KORNEK M. *et al.* 2012). Pacientes portadores de VHC com níveis elevados de ALT (>100 UI/ml) apresentam um maior número de micropartículas circulantes, quando comparados aos pacientes HCV⁺ com níveis de ALT < 40 UI/ml e com indivíduos saudáveis (KORNEK M. *et al.* 2012). Além disso, perfis específicos de MPs podem ser utilizados para monitoramento de progressão e resposta clínica ao tratamento em infecções virais, como aquela causada pelo VHC (JULICH H. *et al.*, 2014).

Sabe-se que o VHC não tem ação citopática direta sobre os hepatócitos, assim, a resposta imune ao vírus parece ser a verdadeira responsável pelas lesões hepáticas (THIO, 2008). Dessa forma, estudos relacionados a moléculas imunológicas importantes, como as quimiocinas, são de grande valia, uma vez que elas podem se tornar alvos futuramente, junto com seus receptores, de uma nova abordagem terapêutica para a hepatite C crônica (PRICE *et al.*, 1999).

As quimiocinas são uma família de pequenas glicoproteínas que podem agir de forma homeostática ou inflamatória, através da ligação a seus receptores, provocando a polarização, migração e extravasamento dos leucócitos do sangue para os tecidos (ZLOTNIK; YOSHIE, 2012). Estas moléculas estão diretamente envolvidas na resposta imune inata e adaptativa contra o vírus VHC, sendo responsáveis por determinar a manutenção ou resolução da infecção viral, uma vez que o vírus C pode ele mesmo modular a produção destas glicoproteínas e a expressão de seus receptores, como forma de escape do sistema imunológico (FAHEY *et al.*, 2014). A resposta imune vigorosa implica na migração de células T específicas para o fígado infectado, e na maioria dos pacientes, essas células são incapazes de resolver a infecção, o que provoca o recrutamento de células T inespecíficas para o sítio da infecção, sendo elas as responsáveis pelas lesões crônicas (THIO, 2008).

Nos processos infecciosos crônicos induzidos durante a infecção pelo VHC, observa-se que as quimiocinas desempenham um importante papel no recrutamento de células do sistema imune. A expressão de quimiocinas, tais como, CCL2, CCL5, CXCL10 e CXCL9 estão envolvidas no processo de imunomodulação durante a infecção crônica pelo vírus C (BRASS & BRENNDÖRFER, 2014). Além disso, as quimiocinas estão sendo avaliadas como possíveis marcadores de RVS durante o tratamento triplo contra infecção pelo VHC (ZEREMSKI M, *et al*, 2015).

O principal método diagnóstico para a hepatite C continua sendo o sorológico para detecção de anticorpos anti-VHC por ELISA (*Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*), que após a infecção torna-se positivo entre 8-12 semanas, ou RIBA (*Recombinant Immunoblot Assay*), que tem sido realizado com o objetivo de avaliar amostras que se apresentam repetidamente reativas no ensaio de rastreio de anticorpos. O segundo método de escolha é a detecção do RNA do vírus no plasma ou soro, detectável após 2 semanas de infecção. Como recomendações, pacientes suspeitos de infecção aguda ou crônica por VHC devem ser primeiramente testados para o anti-VHC, sendo que o teste para detecção do RNA viral deve ser utilizado como confirmatório, quando o teste sorológico é positivo. Em pacientes em que o tratamento é uma opção válida, faz-se necessária a quantificação da carga viral (MS, BRASIL, 2012).

Um teste de laboratório inespecífico importante em pessoas infectadas pelo VHC é a avaliação do nível de ALT, um meio barato e facilmente disponível, de identificação de doença hepática. Ele ainda é o melhor teste para monitoração da infecção pelo VHC e a eficácia da terapia. No entanto, em pessoas com infecção pelo VHC, os níveis de ALT podem estar normais ou variar, e, portanto, um único valor normal não descarta a infecção ativa, doença hepática progressiva, ou até mesmo cirrose. Da mesma forma, a normalização dos níveis desta enzima com a terapia antiviral não é prova do sucesso terapêutico. Além disso, os níveis de ALT podem permanecer elevados por outras razões, mesmo após a negatificação do vírus (LAUER & WALKER, 2001).

O hemograma deve ter atenção especial quanto ao que se refere à leucopenia, sendo este um achado habitual na forma aguda e a plaquetopenia um achado habitual na forma crônica da infecção viral (MS, BRASIL, 2012).

O padrão de fibrose, importante parâmetro de acompanhamento de acometimento hepático, pode ser avaliado através da realização de biópsia hepática. A biópsia hepática apesar de ser um procedimento invasivo, demonstra o estadiamento da hepatite crônica e indicação e/ou condução do tratamento. Realiza-se uma punção transcutânea com agulha para a retirada de fragmentos para a demonstração de alterações específicas. (KLEINER, 2005).

Usualmente, os pacientes são classificados de acordo como escore METAVIR, apresentado abaixo:

Tabela 01- Escore METAVIR para estadiamento da fibrose hepática

METAVIR	
Alteração histológica	Escore
Ausência de fibrose	F0
Expansão fibrosa portal sem septos	F1
Expansão fibrosa com raros septos	F2
Expansão fibrosas com numerosos septos, sem cirrose	F3
Cirrose	F4

Fonte: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR.Cooperative study Group.Hepatology, 1996; 24: 289-293.

A realização da biópsia hepática é indicada observando-se o seguinte critério: Doença hepática compensada; contagem de plaquetas $> 60.000\text{mm}^3$; atividade de protrombina $> 50\%$; ausência de contra indicações às drogas usadas para tratamento. Ainda tem-se como contra indicações relativas: obesidade mórbida e presença de lesões hepáticas vasculares e como contra indicações absolutas: coagulopatias graves, infecção do parênquima hepático e obstrução biliar extra-hepática.

O governo federal brasileiro aprovou alguns inibidores de proteases, e os incluiu como estratégia para o tratamento da Hepatite C. Os inibidores de proteases aprovados e distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são o telaprevir e o boceprevir para serem incorporados no arsenal terapêutico em associação com interferon-alfa peguilado e ribavirina (PEG-IFN + RBV), o que caracteriza a terapia tripla.

Esse esquema terapêutico foi concedido apenas para os pacientes mono infectados pelo genótipo 1 do VHC com fibrose avançada (Metavir F3 e F4) ou cirrose hepática compensada (Child-Pugh ≤ 6) (BRASIL, 2012) (Tabela 02).

Tabela 02 - Escore de Child-Pugh

Cirrose- Fator de classificação de Child-Push	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Bilirrubina sérica $\mu\text{mol/L}$	$< 34 (< 2,0)$	34-51 (2,0-3,0)	$> 51(>3,0)$
Albumina sérica, (g/dL)	$> 35 (> 3,5)$	30-35 (3,0-3,5)	$< 30 (<3,0)$
Ascite	Nenhuma	Facilmente controlada	Mal controlada

Distúrbio neurológico	Nenhum	Mínimo	Coma avançado
Tempo de protrombina (segundos de prolongamento)	0-4	4-6	> 6
RNI	< 1,7	1,7- 2,3	> 2,3

Algumas definições são necessárias para facilitar a classificação dos pacientes, o manejo do tratamento e a melhoria na escolha do esquema terapêutico. O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral e Coinfecções nos trazem algumas delas (BRASIL, 2012).

- Resposta virológica sustentada (RVS): paciente que apresentou VHC-RNA indetectável na 24^a semana de seguimento, após o término do tratamento;
 - Respondedor lento: definido como o indivíduo que apresenta resposta virológica parcial (RVP) com HCV-RNA detectável, porém com queda > 2 Log na semana 12 e VHC-RNA indetectável na 24^a semana de tratamento;
 - Recidivante: paciente que apresentou VHC-RNA indetectável ao final do tratamento, mas não atingiu a RVS, ou seja, apresentou VHC-RNA detectável na semana 24 após o término do tratamento;
 - Não respondedor:
 - Respondedor parcial: paciente que apresentou queda > 2 log do VHC-RNA na semana 12 de tratamento, contudo o VHC-RNA é detectável na 24^a semana de tratamento.
 - Nulo de resposta: paciente que não apresentou queda de pelo menos 2 log do VHC-RNA na semana 12 de tratamento;
- * Pacientes sem documentação de cinética viral durante tratamento prévio serão considerados não respondedores nulos de resposta.

A terapia tripla é recomendada para pacientes que apresentem todos os critérios a seguir: Moninfecção com VHC; genótipo 1 viral; fibrose hepática avançada (Metavir F3 ou F4) ou evidências menos invasivas de cirrose; doença hepática compensada (escore Child-Pugh \leq 6; classe A), sem histórico de descompensação prévia; ausência de tratamento prévio com inibidor de proteases.

O Ministério da Saúde no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções em 2013 indica o uso de telaprevir para pacientes com cirrose hepática compensada (classificação histológica Metavir F4 ou evidências menos invasivas de cirrose), e para pacientes Metavir F3 nulos de resposta a tratamento prévio com interferon-alfa peguilado e Ribavirina. Já o boceprevir deve ser indicado para pacientes com fibrose avançada (Metavir F3 e F4/cirrose), de acordo com critérios de individualização de

tratamento, com base em relatório médico detalhado, relação risco-benefício e autorização dos Comitês Estaduais, fazendo parte deste critério de individualização, antecedente de doença dermatológica grave que com aval médico contra indica o uso de telaprevir por 12 semanas; situações de acordo com o estágio clínico que possam dificultar a avaliação de farmacodermia durante o tratamento com telaprevir, como psoríase extensa, porfiria cutânea tardia, urticária, líquen plano e vasculite cutânea; doenças perianais como fistulas ou trombose hemorroidária prévia que possa piorar com o uso de telaprevir e interações medicamentosas.

A hepatite C é uma doença com impacto na saúde pública indiscutível. O seu enfrentamento requer o seu entendimento. Diante da necessidade de elucidar mecanismos utilizados pelo sistema imune do paciente frente à infecção pelo VHC, este estudo tem como propósito a avaliação do perfil clínico/epidemiológico de pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC, identificação de biomarcadores potenciais de resposta clínica ao tratamento triplo e caracterização da cinética de alterações induzidas pelo tratamento nos parâmetros imunológicos estudados.

4 POPULAÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da população avaliada

Vinte pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica e infectados pelo VHC genótipo 1, idade variando de 47 a 60 anos, que concordaram por escrito em participar da pesquisa pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram recrutados e monitorados. Os pacientes fizeram tratamento com terapia tripla: Interferon-alfapegulado associado à ribavirina e um inibidor de protease (telaprevir ou boceprevir). Dos vinte pacientes, 16/20 (80%) usaram telaprevir e 04/20 (20%) usaram boceprevir.

Estes pacientes concordaram que fossem colhidos 15 mL de sangue periférico antes do tratamento da hepatite C, realizado conforme o protocolo vigente do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG. Outros 15mL de sangue periférico foram coletados durante o tratamento nas seguintes semanas subsequentes ao seu início: 02^a, 04^a, 08^a, 12^a, 24^a e 48^a.

Foram coletadas informações relativas a aspectos demográficos (idade e gênero), uso de álcool e tabaco, provável modo de aquisição do vírus, tempo estimado de infecção, número de tratamentos anteriores, motivo relatado de falha de tratamento anterior, estadiamento da lesão hepática (grau de inflamação e estágio de fibrose hepática, número de traços portais e esteatose em ultrassonografia), aspectos virológicos (genótipo do vírus, carga viral antes e durante o tratamento), aspectos laboratoriais (hemograma e enzimas hepáticas) e de resposta terapêutica (sinais e sintomas clínicos durante o tratamento, alterações nas doses de medicações, uso de medicação estimulante de produção celular, resultado do tratamento).

Vinte indivíduos saudáveis doadores de sangue do banco de sangue do Hospital Felício Rocho, idade entre 25 e 50 anos, foram recrutados e após terem concordado em participar do estudo como voluntários e assinado o TCLE, compuseram o grupo controle do estudo para estabelecimento dos valores de referência das quimiocinas e micropartículas circulantes avaliadas. Foram coletados 10 mL de sangue total sem anticoagulante e 5mL de sangue total em citrato de sódio. Os valores de referência dos dois parâmetros foram estabelecidos pelos respectivos intervalos interquartis dos valores encontrados para cada um dos parâmetros avaliados.

4.2 Procedimentos éticos

O projeto foi aprovado pelo COEP/UFMG#CAAE-15732513.0.1001.5149 com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos vinte pacientes (n=20) com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica, através de sorologia anti-VHC positiva (ELISA de terceira geração) e pesquisa de RNA do VHC positiva (AMPLICOR[®], Roche Molecular Systems), limite inferior de detecção de 12 UI/mL, infectados pelo genótipo 1 do vírus.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com hepatite C crônica coinfectados por outros vírus, tais como, o HIV e o vírus da hepatite B crônica, bem como os portadores de outras formas de doença hepática crônica e portadores de cirrose hepática descompensada. Pacientes etilistas, ou seja, com consumo regular de álcool acima de 20g/dia (para o sexo feminino) e acima de 40g/dia (para o sexo masculino) também foram excluídos.

4.3 Obtenção das amostras biológicas

4.3.1 Soro

Para a obtenção do soro, foram coletados 10 mL de sangue total sem anticoagulante. As amostras coletadas foram submetidas à centrifugação a 200 x g, 4°C por 20 minutos. Após centrifugação, o soro foi fracionado em alíquotas de 1mL em microtubos de 1,5 mL, que em seguida, foram armazenados a -80°C até a sua utilização.

4.3.2 Plasma

Para a obtenção do plasma, foram coletadas as amostras de 10 mL de sangue total em heparina sódica. As amostras de sangue heparinizadas foram submetidas à centrifugação a 200 x g, 4°C por 20 minutos. Após centrifugação, o plasma foi fracionado em alíquotas de 1mL em microtubos de 1,5 mL, que em seguida, foram armazenados a -80°C até a sua utilização.

Cinco mililitros de sangue total foram também coletados em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio. As amostras citratadas foram submetidas à centrifugação a 500xg, 4°C por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP), que foi utilizado nas análises de micropartículas descritas no item **4.7 *Quantificação dos níveis de***

micropartículas (MPs) no plasma dos pacientes desse tópico. Após centrifugação, o plasma foi fracionado em alíquotas de 1mL em microtubos de 1,5 mL, que em seguida, foram armazenados a -80°C até a sua utilização.

Cinco mililitros de sangue total foram coletados em EDTA para realização do hemograma.

4.4 Obtenção de dados clínico-laboratoriais de rotina

Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes. Os dados foram: número de registro; nome completo e idade; número de tratamentos anteriores; tipo de tratamento anterior; modo provável de aquisição da infecção por VHC; tempo estimado de infecção pelo VHC; genótipo viral; uso de álcool, tempo (anos) de uso de álcool e quanto tempo (anos) interrompeu o uso de álcool; tempo (anos) de uso de tabaco e por quanto tempo (anos) interrompeu o uso de tabaco; tipo de resposta aos tratamentos anteriores; efeitos colaterais durante o tratamento e tipo de resposta ao tratamento atual. Os dados laboratoriais de rotina incluídos no estudo foram o hemograma e a quantificação das transaminases hepáticas ALT e AST.

4.5 Hemograma

Os resultados de hemograma foram obtidos através dos testes realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, utilizando-se as amostras de sangue total coletadas em EDTA. As análises foram realizadas no aparelho automático Cell-Dyn Rubi®. Foram incluídos no estudo os dados referentes à concentração de hemoglobina (g/dL), contagem global de leucócitos/mm³, contagem absoluta das subpopulações de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos)/mm³ e contagem de plaquetas/mm³.

4.6 Dosagem de enzimas hepáticas

Os resultados de enzimas hepáticas foram obtidos através dos testes realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, utilizando-se amostras de soro. As análises foram realizadas em aparelhos automáticos da marca Vitrus® 5.1 ou Vitrus® 5.600. Foram incluídos no estudo as dosagem de ALT e AST que foram expressas em UI/L.

4.7 Dosagens de quimiocinas

A dosagem das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 foi realizada utilizando-se o *kit* comercial *HumanChemokine*

Kit (Cytometric BeadArray - CBA, BD Pharmingen) com algumas modificações. As amostras de soro foram descongeladas em banho maria a 37°C, posteriormente, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 15.300 x g, 22°C por 5 minutos. Um volume de 26µL/poço de cada amostra foi pipetado em placa de 96 poços de fundo em U (Falcon/BD). A curva padrão (20pg/mL a 2500 pg/mL) foi preparada de acordo com o manual do fabricante, sendo reduzido somente o volume final a ser pipetado na placa (26 µl). As etapas subsequentes foram otimizadas com a adição de 15µl/poço da mistura de microesferas de captura, contendo anticorpos aderidos contra os analitos de interesse. Em seguida, foram adicionados 17µl do conjugado, contendo uma mistura de anticorpos monoclonais contra os analitos de interesse marcados com ficoeritrina (PE), seguidos de homogeneização. A placa foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente, em agitador orbital e ao abrigo da luz. Depois do período de incubação, as microesferas foram lavadas com tampão de lavagem e centrifugadas a 400xg, 18°C por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante por inversão da placa e ressuspendendo-se as microesferas em tampão de lavagem para a leitura no citômetro de fluxo FACS Verse (BD Biosciences) com aquisição dos dados utilizando-se o software FACS Suite (BD Biosciences). Foram adquiridas pelo menos 500 microesferas/analito avaliado. Os dados foram expressos em intensidade média de fluorescência (*Mean Fluorescence Intensity* - MFI). Os resultados de concentração final das quimiocinas foram calculados a partir da construção de uma curva-padrão, utilizando-se quimiocinas recombinantes, contendo valores de concentração conhecidos. O cálculo de concentração foi realizado empregando-se a equação do quinto parâmetro logístico por meio do software FCAP Array 3.0 (Soft Flow). Os resultados foram expressos em pg/mL. A Figura 02 ilustra a sequência de procedimentos necessária para dosagem de quimiocinas pelo método CBA.

Tabela 03- Quimiocinas avaliadas durante o estudo com seus respectivos principais tipos celulares quimioatraentes

Quimiocina	Tipo celular
CCL2/MCP-1	Monócitos
CCL5/RANTES	Linfócitos inflamatórios
CXCL8/IL-8	Neutrófilos
CXCL9/MIG	Células endoteliais e inflamatórias
CXCL10/IP-10	Células endoteliais e inflamatórias

Fonte: ABBAS, ABUL K, 2005

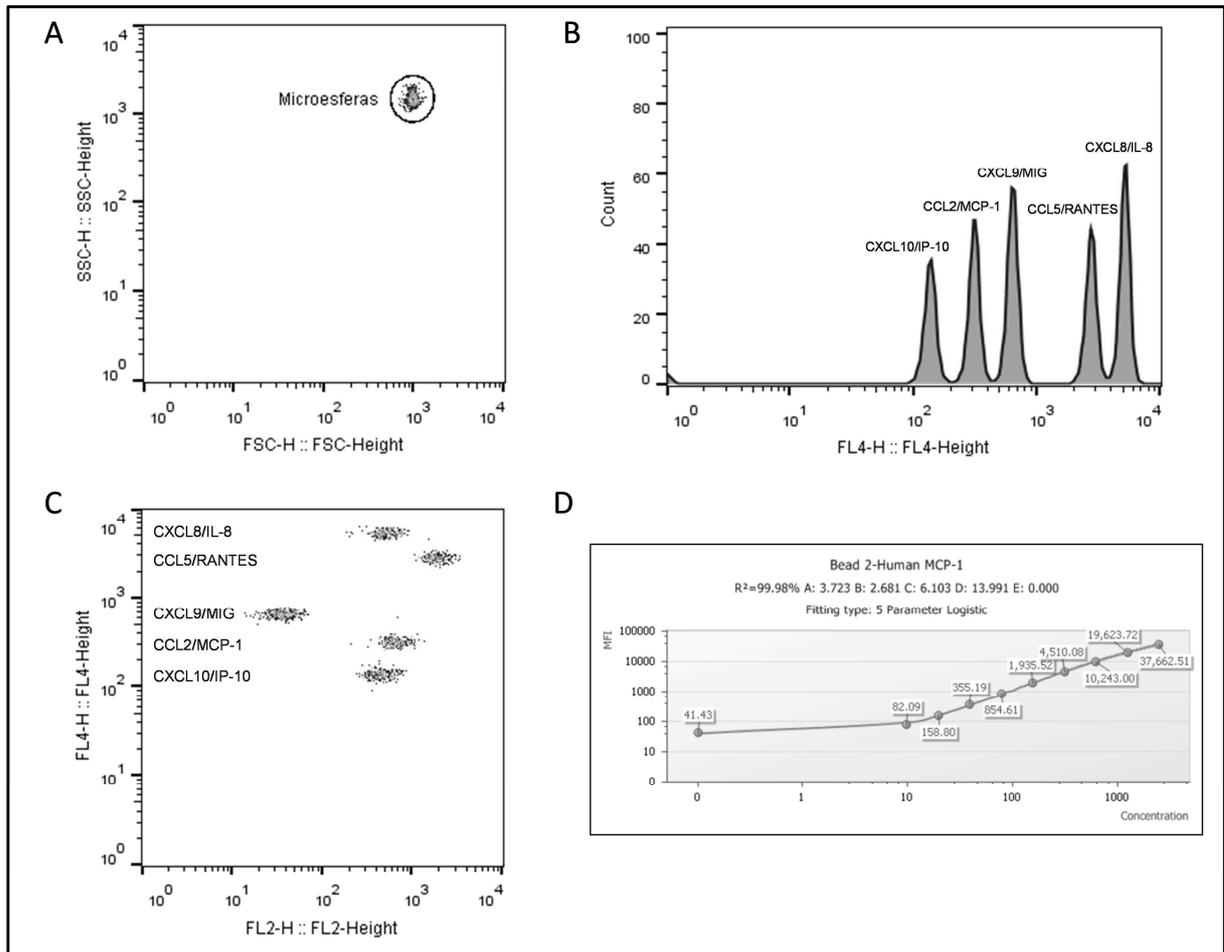


Figura 02: Representação esquemática da análise de quimiocinas, por meio do ensaio com microesferas fluorescentes por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array*- CBA). (A) Delimitação da região de microesferas, através de gráficos de densidade de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) versus granulosidade (*Side Scatter* - SSC). (B) Histograma de discriminação das microesferas, de acordo com a intensidade de fluorescência 4 (FL4), apresentada por cada microesfera ao longo do eixo X, onde avalia-se a intensidade de FL4 capaz de discriminar as diferentes microesferas versus número de eventos. (C) Discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de quimiocinas, que apresentam diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL4) em gráficos de densidade de FL2 (onde será avaliada a intensidade média de fluorescência- *Mean Fluorescence Intensity*- MFI para o cálculo de concentração das quimiocinas) versus FL4. (D) Curva padrão representativa construída por meio das medidas de MFI de cada quimiocina analisada (nesse exemplo, CCL2/MCP-1) versus concentrações crescentes de cada quimiocina recombinante (20 pg/mL a 2500 pg/mL), utilizando-se como base de cálculo a equação do quinto parâmetro logístico.

4.8 Quantificação dos níveis de micropartículas (MPs) no plasma dos pacientes

A quantificação das MPs no plasma foi realizada pela citometria de fluxo, adaptada dos protocolos descritos anteriormente (Bode and Hickerson, 2000; Campos *et al.*, 2010; Couper *et al.*, 2010). O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido como descrito no **item 4.3 Obtenção das amostras biológicas**. Em seguida, o PPP foi centrifugado a alta rotação (13.000 x g), 4°C por 3 minutos, para obtenção do plasma livre de plaquetas (PLP). Finalmente, 100 µL do PLP foram diluídos em solução de PBS contendo sódio e heparina sódica (1 µg/mL) (diluição de 1:3) e novamente centrifugados a 14.000 x g, 15°C por 90 minutos. O sedimento rico em MPs foi ressuspenso no tampão de ligação que contém cloreto de cálcio à Anexina V (BD Biosciences) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC - Fluorescência 1) ou ficoeritrina (PE - Fluorescência 2). As MPs foram quantificadas por citometria de fluxo por meio da calibração com microesferas fluorescentes (Spherotech Inc.) de tamanho definido (0,7 a 0,9 µm). Dez microlitros das microesferas foram adicionados à 100 µL de PBS 1X estéril. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACS calibur (BD Biosciences), sendo adquiridos pelo menos 50.000 eventos/amostra. Os resultados foram expressos em percentual de cada micropartícula avaliada (Tabela 04). A Figura 03 ilustra esquematicamente a sequência de procedimentos necessária para análise de micropartículas.

Tabela 04- Fenótipos utilizados para os marcadores celulares avaliados na população de micropartículas circulantes

Fenótipo	Fluorocromo	Clone	Diluição	Marcador
Anti-CD14	PerCP	47-3D6	1:25	Monócito
Anti-CD3	PE	UCHT1	1:25	Linfócito T
Anti-CD8	FITC	SK1	1:25	Linfócito T citotóxico
Anti-CD4	FITC	4B12	1:25	Linfócito T auxiliar
Anti-CD45	APC	HI30	1:25	Leucócito
Anti-CD235a	PE-Cy5	GA-R2 (HIR2)	1:10000	Eritrócito
Anti-CD51	PE	23C6	1:25	Célula endotelial
Anti-CD41a	PerCP	HIP8	1:25	Plaqueta
Anti-CD66b	PE	B1.1/CD66	1:25	Neutrófilo

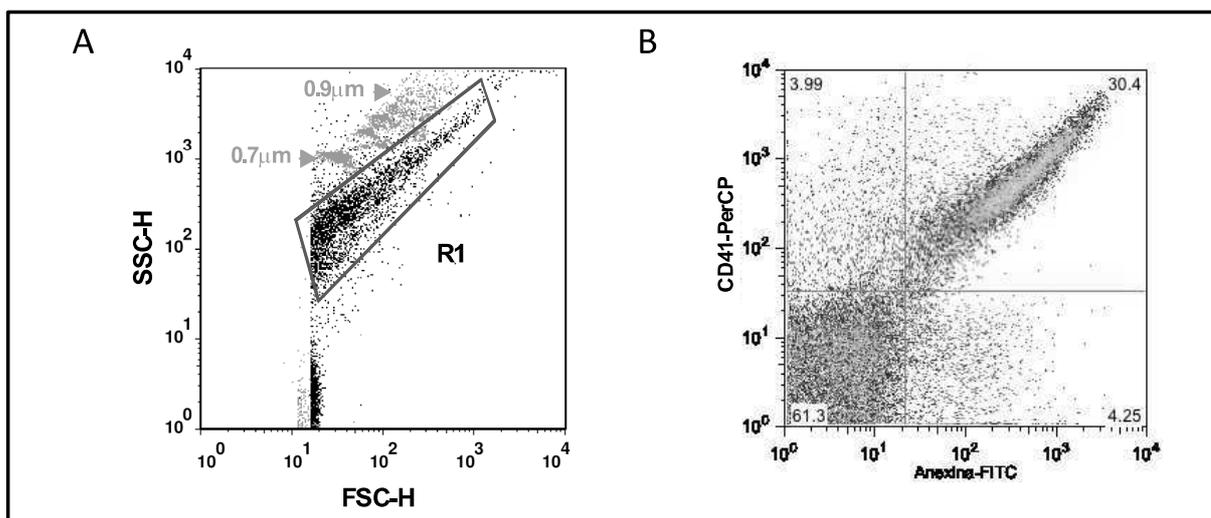


Figura 03: Representação esquemática da análise de micropartículas em plasma livre de plaquetas de paciente portador da infecção crônica pelo vírus da hepatite C antes do tratamento. (A) Delimitação da região de micropartículas (R1) com microesferas de tamanhos definidos (0,7 - 0,9 μm) em gráficos de distribuição pontual de tamanho (*Forward Scatter*- FSC) versus granulosidade (*Side Scatter*- SSC). (B) Análise representativa da frequência percentual de micropartículas de plaquetas CD41⁺ em gráficos de densidade de Anexina V (marcador de micropartículas) conjugada com isotiocianato de fluoresceína – FITC versus CD41-PerCP (marcador de plaquetas). O gráfico foi dividido em quadrantes que representam as subpopulações encontradas na amostra avaliada. Os resultados analisados foram expressos em percentual e estão apresentados dentro de cada quadrante. Os dados utilizados durante esse estudo são referentes ao quadrante duplo-positivo (nesse exemplo, a frequência percentual de micropartículas de plaquetas é de 30,4%, equivalente as micropartículas que apresentaram o fenótipo Anexina V⁺ CD41⁺).

4.9 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.) para comparação entre os grupos. Para a análise comparativa entre os grupos foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para dados não paramétricos. Para a análise comparativa entre dois grupos foi empregado o teste T de *Student* para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. As correlações analisadas entre parâmetros avaliados durante o estudo foram realizadas utilizando-se o teste de correlação de Spearman (r). As análises de rede de interações foram realizadas por meio do software Cytoscape 2.8 (*Cytoscape Consortium*). Em todos os casos, as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o valor de p foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS

Apresentação dos resultados

Os resultados serão apresentados em quatro tópicos distintos, de acordo com as denominações a seguir:

- Tópico I: Aspectos clínico-laboratoriais, antes e durante o tratamento triplo.
- Tópico II: Perfil de quimiocinas circulantes antes e durante o tratamento triplo.
- Tópico III: Perfil de micropartículas circulantes antes e durante o tratamento triplo.
- Tópico IV: Perfil panorâmico de biomarcadores antes e durante o tratamento triplo.

5.1 TÓPICO I

Aspectos clínico-laboratoriais, antes e durante o tratamento triplo

Tabela 05- Dados demográficos, carga viral e genótipo viral de pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC avaliados durante o estudo com tratamento triplo

DADOS DEMOGRÁFICOS	
IDADE (anos)	
Variação	47-60
Média ± DP	58,5 ± 5,7
Mediana (P25-P75)	59,5 (55-62)
SEXO	
Masculino	13/20 (65,0%)
Feminino	07/20 (35,0%)
CARGA VIRAL (UI/mL) PARA VHC DOS PACIENTES ANTES DO TRATAMENTO TRIPLO	
Variação	155.669,0 -9.411.641,0
Média ± DP	2.505.842,0 ± 2.607.632,6
Mediana (P25-P75)	1.452.284,5(636.943,0 -3.419.000,0)
GENÓTIPO DO VÍRUS VHC	
GENÓTIPO	
1b	14/20 (70,0%)
1a	06/20 (30,0%)

A Tabela 05 mostra os dados demográficos, carga e genótipo viral de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC avaliados durante o estudo com tratamento triplo. No início do estudo, os pacientes possuíam idade entre 47 e 60 anos (média ± DP de 58,5 ± 5,7 anos e mediana de 59,5 anos). Quanto ao sexo, a maioria dos pacientes 13/20 (65,0%) eram do sexo masculino e 07/20 (35,0%) eram do sexo feminino. A carga viral inicial variou entre 155.669,0 a 9.411.641,0 UI/ml (média ± DP de 2.505.842,0 ± 2.607.632,6 UI/mL e mediana 1.452.284,5 UI/mL). Todos os pacientes incluídos no estudo possuíam o vírus de genótipo tipo 1, sendo subdivididos em 14/20 (70,0%) como portadores do genótipo 1b e 06/20 (30,0%) como portadores do genótipo 1a.

Tabela 06 - Provável modo de aquisição e tempo estimado de infecção pelo VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo

PROVÁVEL MODO DE AQUISIÇÃO DO VÍRUS VHC	
Hemotransfusão	07/20 (35,0%)
Droga injetável	03/20 (15,0%)
Material médico não descartável	03/20 (15,0%)
Sexual	01/20 (5,0%)
Tatuagem	01/20 (5,0%)
Ignorado	05/20 (25,0%)
TEMPO (ANOS) ESTIMADO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS VHC	
Variação	22,0 – 38,0
Média ± DP	32,1
Mediana (P25-P75)	34,0 (27,0 - 36,7)
Ignorado	04/20 (20,0%)

A Tabela 06 mostra o provável modo de aquisição e o tempo estimado de infecção pelo vírus VHC pelos pacientes com hepatite C crônica, avaliados durante o estudo com tratamento triplo. Foi relatado o seguinte: 07/20 (35,0%) por hemotransfusão, 03/20 (15,0%) por uso de droga injetável, 03/20 (15,0%) por uso de material médico não descartável, 01/20 (5,0%) por via sexual e 01/20 (5,0%) por tatuagem; em 05/20 (25,0%) não foi possível identificar o provável modo de aquisição do vírus. O tempo estimado de infecção pelo vírus VHC variou de 22,0 a 38,0 anos (média ± DP de 32,1 anos e mediana de 34,0 anos); em 04/20 (20%) casos não foi possível estimar o tempo de infecção.

Tabela 07- Carga viral para VHC de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC durante o tratamento triplo

CARGA VIRAL PARA VHC DOS PACIENTES DURANTE O TRATAMENTO TRIPLO					
Tempo /	2 semanas	8 semanas	12 Semanas	24 semanas	48 semanas
Situação	número total de pacientes n= 20	número total de pacientes n= 20	número total de pacientes n= 19 (01 tratamento suspenso desde a avaliação anterior)	número total de pacientes n= 18 (01 tratamento suspenso desde a avaliação anterior)	número total de pacientes n= 12 (03 tratamentos suspensos devido a efeito colateral, 01 abandono, 02 tratamentos suspensos devido a carga viral positiva desde a avaliação anterior)
Negativo (dos que realizaram o exame)	19/19 (100,0%) (N= 19 porque 01 paciente estava sem resultado).	17/17 (100,0%) (N=17porque 01 paciente não realizou o exame; 01 paciente teve tratamento suspenso por efeito colateral; 01 sem resultado).	17/17 (100,0%) (N= 17porque 01 paciente não realizou o exame; 01 paciente teve o tratamento suspenso por efeito colateral).	12/14 (86,0%) (N= 14 porque 03 pacientes tiveram o tratamento suspenso por efeito colateral; 01 paciente abandonou o tratamento).	12/12 (100,0%) (N= 12)
Positivo (dos que realizaram o exame)	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/17 (0,0%)	02/14 (14,2%)	0/12 (0,0%)
Sem resultado	01/20 (5,0%)	01/20 (5,0%)	0/19 (0,0%)	0/18 (0,0%)	0/12 (0,0%)
Não realizado	0/20 (0,0%)	01/20 (5,0%)	01/19 (5,2%)	0/18 (0,0%)	0/12 (0,0%)
Tratamento suspenso por efeito colateral	0/20 (0,0%)	01/20 (5,0%)	01/19 (5,2%)	03/18 (17,0%)	0/12 (0,0%)
Abandono de tratamento	0/20 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/19 (0,0%)	01/18 (5,5%)	0/12 (0,0%)

A Tabela 07 mostra o perfil da carga viral para VHC de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC durante o tratamento triplo. Durante o acompanhamento dos pacientes, foi observado que o tratamento foi suspenso devido a efeitos colaterais em 05/20 (25%) pacientes, sendo 01/20 (5,0%) na semana 8, 01/20(5,0%) na semana 12 e 03/20 (15,0%) na semana 24. O resultado da carga viral apresentou positividade em 02/20(10,0%) pacientes, o que levou à suspensão do tratamento. O resultado da carga viral apresentou negatividade da seguinte forma:

Semana 02 (total n= 20): 19 pacientes realizaram a carga viral e em todos 19/19 (100%) os resultados foram negativos. Em 01/20 (5,0%) o resultado não foi disponibilizado.

Semana 08 (total n= 20): 17 pacientes realizaram a carga viral e em todos 17/17 (100%) os resultados foram negativos. Em 01/20 (5,0%) o exame não foi realizado, em 01/20 (5,0%) o tratamento foi suspenso devido a efeitos colaterais e em 01/20 (5,0%) o resultado não foi disponibilizado.

Semana 12 (total n= 19): 17 pacientes realizaram a carga viral e em todos 17/17 (100%) os resultados foram negativos. Em 01/19 (5,2%) o exame não foi realizado e em 01/19 (5,2%) o tratamento foi suspenso devido a efeitos colaterais.

Semana 24 (total n= 18): 14 pacientes realizaram a carga viral e em 12/14 (86,0%) os resultados foram negativos. Em 02/14 (14,2%) o resultado de carga viral foi positivo, o que motivou a suspensão do tratamento.

Semana 48 (total n= 12): 12 pacientes realizaram a carga viral e em todos 12/12 (100%) os resultados foram negativos.

Tabela 08- Principais sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC durante o tratamento triplo

Sinais e sintomas clínicos	2 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas	24 semanas	48 Semanas	Porcentagem
Prurido Cutâneo	03	04	06	01	02	00	8,0%
Fadiga	02	04	02	05	01	00	7,0%
Náusea	02	04	03	05	00	00	7,0%
Astenia	01	01	04	04	02	00	6,0%
Rash	04	03	02	01	02	00	6,0%
Vômitos	03	04	02	03	00	00	6,0%
Hiporexia	01	03	03	01	02	00	5,0%
Insônia	01	01	02	01	02	00	3,0%
Prurido anal	00	03	00	02	00	00	3,0%
Fraqueza	01	02	02	01	01	00	3,0%
Assintomático	06	06	00	05	00	03	12,0%

A Tabela 08 mostra os principais sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC durante o tratamento triplo. Ao longo do tratamento, 12,0% dos pacientes permaneceram assintomáticos. Aqueles pacientes que apresentaram alguma alteração relataram em prontuário 45 (quarenta e cinco) tipos diferentes de sinais e sintomas clínicos. Os dez sinais e sintomas clínicos mais frequentes foram prurido cutâneo (8,0%), fadiga e náusea (7,0% cada um), astenia, *rash* e vômitos (6,0% cada um), hiporexia (5,0%), insônia (3,0%), prurido anal e fraqueza (3,0% cada um). Os sinais e sintomas clínicos surgiram após duas semanas de início do tratamento e tiveram o seu pico na quarta semana. Na oitava semana de tratamento, houve uma redução dos relatos, na décima segunda semana, houve um novo aumento, na vigésima quarta semana os relatos diminuíram expressivamente e na quadragésima oitava semana não foram relatados mais sinais e sintomas clínicos.

Tabela 09- Uso, tempo de uso e tempo de interrupção do uso de álcool por pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo

USO, TEMPO DE USO E TEMPO DE INTERRUÇÃO DO USO DE ÁLCOOL	
Sim	08/20 (40,0 %)
Não	10/20 (50,0%)
Ignorado	02/20 (10,0%)
TEMPO (ANOS) DE USO DE ÁLCOOL	
Varição	10,0 – 40,0
Média ± DP	27,0 ± 11,0
Mediana (P25-P75)	30,0 (15,0 – 35,0)
TEMPO (ANOS) DE INTERRRUPÇÃO DO USO DE ÁLCOOL	
Varição	01,0 – 20,0
Média ± DP	8,4 ± 8,3
Mediana (P25-P75)	05,0 (0,8 – 18,0)

A Tabela 09 mostra o uso, tempo de uso e tempo de interrupção do uso de álcool por pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo. Em relação ao consumo de álcool com volume maior que 40mg/dia, 08/20 (40,0%) afirmaram que eram consumidores de álcool e 10/20 (50,0%) que não consumiam álcool; em 02/20 (10,0%) casos não foi possível confirmar esta informação. Quanto ao tempo de uso de álcool em anos, observou-se uma variação ampla de 10 a 40 anos (média ± DP de 27,0 ± 11,0 anos e mediana de 30,0 anos). Dos que se declararam consumidores de álcool, o tempo de interrupção do uso de álcool (para iniciar o tratamento é obrigatória a interrupção do consumo de álcool) variou entre 01 a 20 anos (média ± DP de 8,4 ± 8,3 anos e mediana de 05,0 anos).

Tabela 10 - Uso, tempo de uso e tempo de interrupção do uso de tabaco por pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo

USO, TEMPO DE USO E TEMPO DE INTERRUPTÃO DO USO DE TABACO	
Sim	06/20 (30,0%)
Não	13/20 (65,0%)
Ignorado	01/20 (5,0%)
TEMPO (ANOS) DE USO DE TABACO	
Varição	02,0 – 35,0
Média ± DP	17,3 ± 12,0
Mediana (P25-P75)	16,5 (8,0 - 26,7)
TEMPO (ANOS) DE INTERRRUPÇÃO DO USO DE TABACO	
Varição	01,0 – 29,0
Média ± DP	13,0 ± 10,2
Mediana (P25-P75)	13,0 (1,0 – 21,0)

A Tabela 10 mostra o uso, tempo de uso e tempo de interrupção do uso de tabaco por pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo com tratamento triplo. No que se refere ao consumo de tabaco, 06/20 (30,0%) afirmaram que eram consumidores de tabaco e 13/20 (65,0%) que não consumiam tabaco; em 01/20 (5,0%) não foi possível confirmar esta informação. Quanto ao tempo de uso de tabaco, observou-se também uma variação ampla de 02 a 35 anos (média ± DP de 17,3 ± 12,0 anos e mediana de 16,5 anos). Dos que se declararam consumidores de tabaco, o tempo de interrupção do uso de tabaco variou entre 01 a 29 anos (média ± DP de 13,0 ± 10,2 anos e mediana de 13,0 anos).

Tabela 11 - Número de tratamentos anteriores contra o vírus VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus, avaliados durante o estudo com tratamento triplo

NÚMERO DE PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTOS PRÉVIOS CONTRA O VHC	
Nenhum	08/20 (40,0%)
Um	09/20 (45,0%)
Dois	03/20 (15,0%)

A Tabela 11 mostra o número de tratamentos anteriores contra o vírus VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus, avaliados durante o estudo com tratamento triplo. Em 08/20 (40,0%) pacientes não haviam sido realizado tratamento anterior contra o VHC, 09/20 (45,0%) haviam realizado um tratamento anterior e 03/20 (15,0%) já haviam realizado dois tratamentos anteriores ao atual.

Tabela 12 - Motivos relatados da falha de tratamentos anteriores contra o vírus VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus, avaliados durante o estudo com tratamento triplo

MOTIVO RELATADO DA FALHA DE TRATAMENTOS PRÉVIOS CONTRA O VHC	
Recidivante	06/12 (50,0%)
Não respondedor	02/12 (16,7%)
Suspensão (efeitos colaterais graves)	01/12 (8,3%)
Ignorado	03/12 (25,0%)

A Tabela 12 mostra os motivos relatados da falha de tratamentos anteriores contra o vírus VHC pelos pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus, avaliados durante o estudo com tratamento triplo. O motivo relatado da falha de tratamentos anteriores contra o vírus VHC dos doze pacientes que já haviam realizado tratamento anterior foi em 06/12 (50,0%) devido à recidiva, 02/12 (16,7%) por não resposta ao tratamento e 01/12 (8,3%) pelo tratamento anterior ter sido suspenso devido a efeitos colaterais graves; em 03/12 (25,0%) não foi possível identificar o motivo da falha do tratamento prévio.

Tabela 13- Resultado do tratamento triplo de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, avaliados durante o estudo

RESULTADO DO TRATAMENTO TRIPLO	
Resposta virológica sustentada (RVS)	12/14 (85,7%)
Respondedor parcial	02/14 (14,3%)
Tratamento suspenso (evento adverso*)	05/20 (25,0%)
Abandono de tratamento	01/20 (5,0%)

*Paciente 005: Perda de peso acentuada e diarreia persistente;
Paciente 010: Mal estar, boca seca, palidez cutânea;
Paciente 014: Plaquetopenia, neutropenia e febre;
Paciente 025: Astenia, vômitos, mal estar geral;
Paciente 026: Intolerância medicamentosa.

A Tabela 13 mostra o resultado do tratamento triplo de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC avaliados durante o estudo. Dos 14 pacientes que finalizaram o tratamento, 12/14 (85,7%) obtiveram resposta virológica sustentada. Apenas 02/14 (14,3%) dos pacientes tiveram resposta parcial, obtendo carga viral positiva na 24ª semana de tratamento e um paciente 01/20 (5,0%) abandonou o tratamento. O tratamento foi suspenso em 05/20 (25,0%), devido a eventos adversos: Paciente 005: Perda de peso acentuada e diarreia persistente; paciente 010: mal estar, boca seca, palidez cutânea; paciente 014: plaquetopenia, neutropenia e febre; paciente 025: astenia, vômitos, mal estar geral e paciente 026: intolerância medicamentosa. Em todos os casos o medicamento administrado era telaprevir.

5.1.1 Concentração de HEMOGLOBINA de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

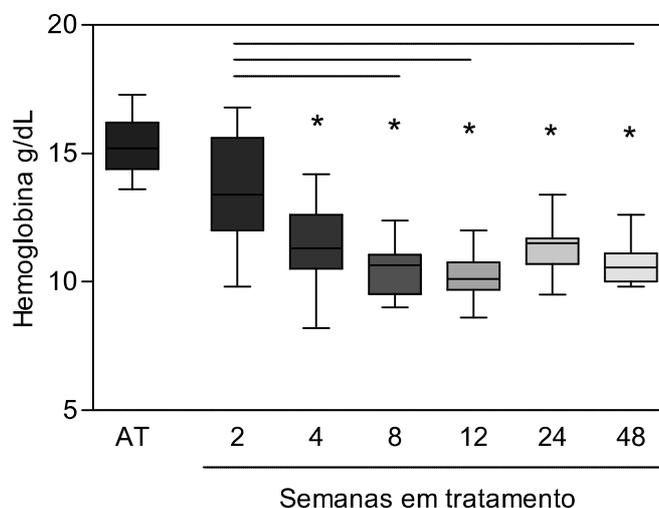


Gráfico 01: Análise da concentração de hemoglobina de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em g/dL. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise dos níveis de hemoglobina demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Além disso, houve uma redução significativa da hemoglobina nas semanas 8, 12 e 48 em comparação à semana 2 de tratamento (Gráfico 01). Cabe ressaltar que as alterações encontradas na concentração de hemoglobina foram as mesmas, incluindo-se ou excluindo-se das análises os pacientes que fizeram uso de eritropoetina durante o tratamento triplo.

5.1.2 Contagem GLOBAL DE LEUCÓCITOS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

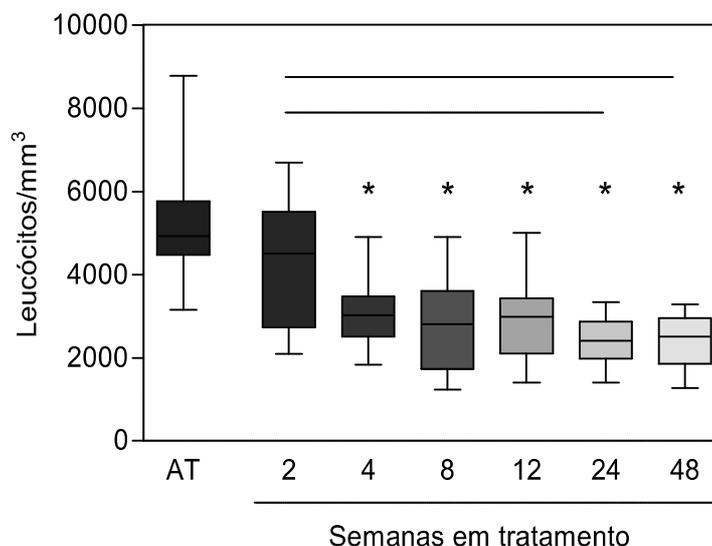


Gráfico 02: Análise da contagem global de leucócitos de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em mm^3 . Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise da contagem global de leucócitos demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento (Gráfico 02). Além disso, houve uma redução significativa da contagem global de leucócitos nas semanas 24 e 48 em comparação à semana 2 de tratamento. Cabe ressaltar que as alterações encontradas na contagem global de leucócitos foram as mesmas, incluindo-se ou excluindo-se das análises os pacientes que fizeram uso de filgrastim durante o tratamento triplo.

5.1.3 Contagem do número absoluto de NEUTRÓFILOS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

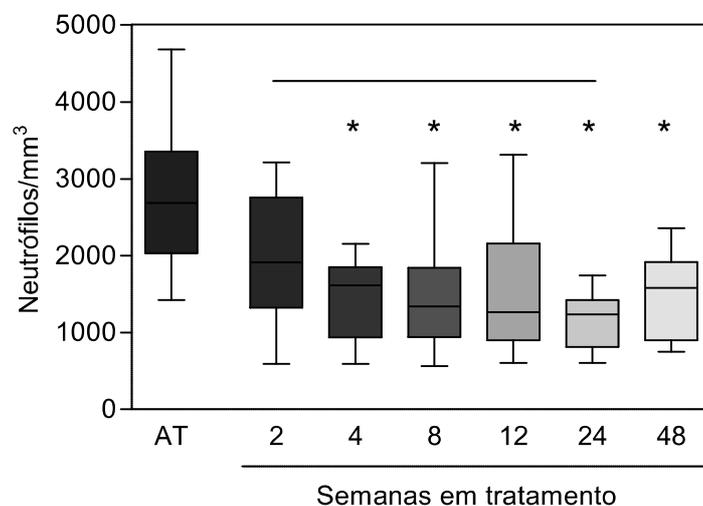


Gráfico 03: Análise da contagem do número absoluto de neutrófilos de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em mm^3 . Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise da contagem do número absoluto de neutrófilos demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Além disso, houve uma redução significativa do número absoluto de neutrófilos na semana 24 em comparação à semana 2 de tratamento (Gráfico 03). Cabe ressaltar que as alterações encontradas no número absoluto de neutrófilos foram as mesmas, incluindo-se ou excluindo-se das análises os pacientes que fizeram uso de filgrastim durante o tratamento triplo.

5.1.4 Número absoluto de LINFÓCITOS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

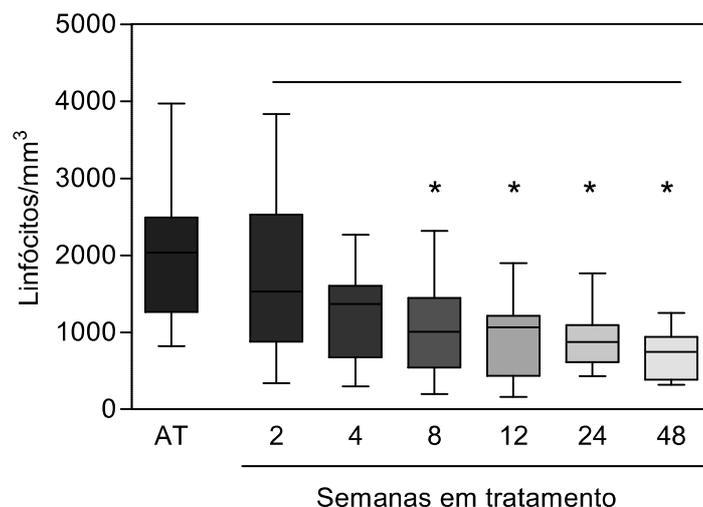


Gráfico 04: Análise da contagem do número absoluto de linfócitos de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em mm^3 . Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise da contagem do número absoluto de linfócitos demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 8 a 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento (Gráfico 04). Além disso, houve uma redução significativa do número de linfócitos na semana 48 em comparação à semana 2 de tratamento. Cabe ressaltar que as alterações encontradas no número absoluto de linfócitos foram as mesmas, incluindo-se ou excluindo-se das análises os pacientes que fizeram uso de filgrastim durante o tratamento triplo.

5.1.5 Número absoluto de PLAQUETAS de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

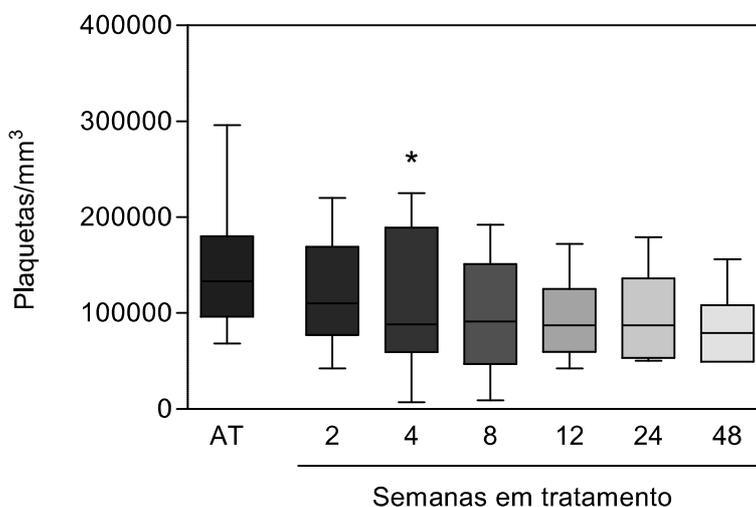


Gráfico 05: Análise do número absoluto de plaquetas de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em mm^3 . Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise da contagem do número absoluto de plaquetas demonstrou uma redução significativa desse parâmetro na semana 4 após início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 05).

5.1.6 Níveis de ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

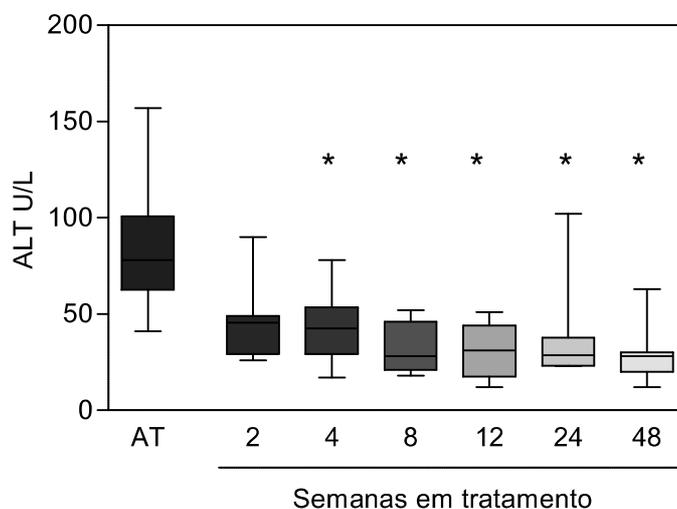


Gráfico 06: Análise dos níveis de Alanina aminotransferase (ALT) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em U/L. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise dos níveis de ALT demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 06).

5.1.7 Níveis de ASPARATO AMINOTRANSFERASE (AST) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

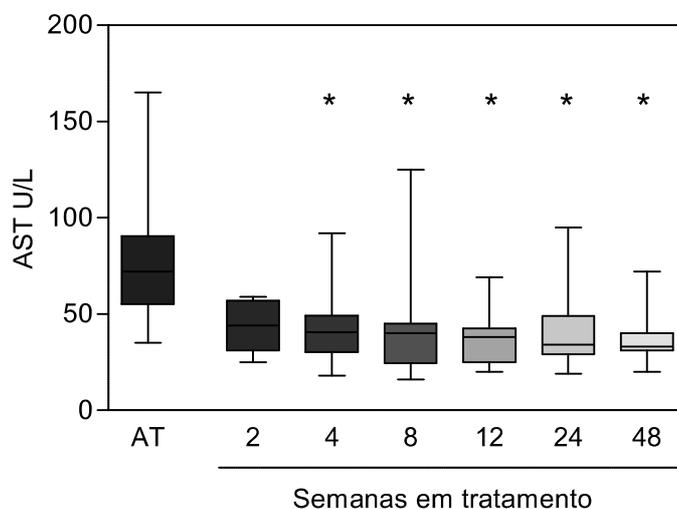


Gráfico 07: Análise dos níveis de Aspartato aminotransferase (AST) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em U/L. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência: Laboratório Central do Hospital das Clínicas, 2015).

A análise dos níveis de AST demonstrou uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 07).

5.2 TÓPICO II

Perfil de quimiocinas circulantes antes e durante o tratamento triplo

5.2.1 Níveis circulantes de CCL2/MCP-1 provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

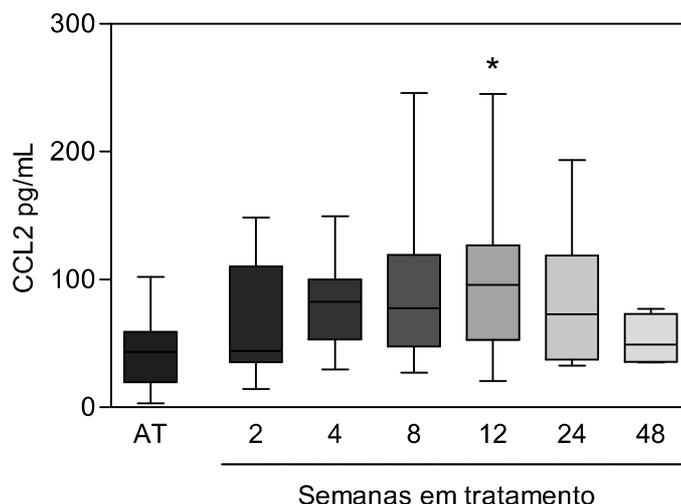


Gráfico 08: Análise dos níveis circulantes de CCL2/MCP-1 de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em pg/mL. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 3.490,0 a 9.945,0 pg/mL, GIPB, 2015).

A análise dos níveis circulantes de CCL2/MCP-1 demonstrou um aumento significativo desse parâmetro na semana 12, após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 08).

5.2.2 Níveis circulantes de CCL5/RANTES provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

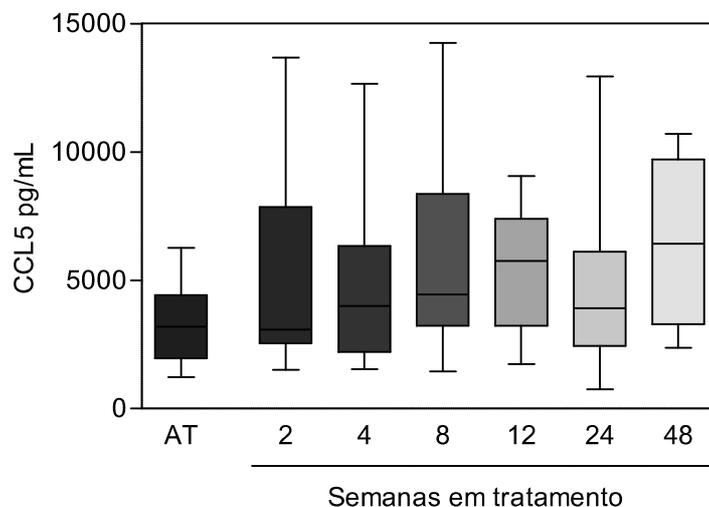


Gráfico 09: Análise dos níveis circulantes de CCL5/RANTES de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em pg/mL. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 3.490,0 a 9.945,0 pg/mL, GIPB, 2015).

Os níveis circulantes de CCL5/RANTES dos pacientes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas antes e durante o tratamento (Gráfico 09).

5.2.3 Níveis circulantes de CXCL8/IL-8 provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

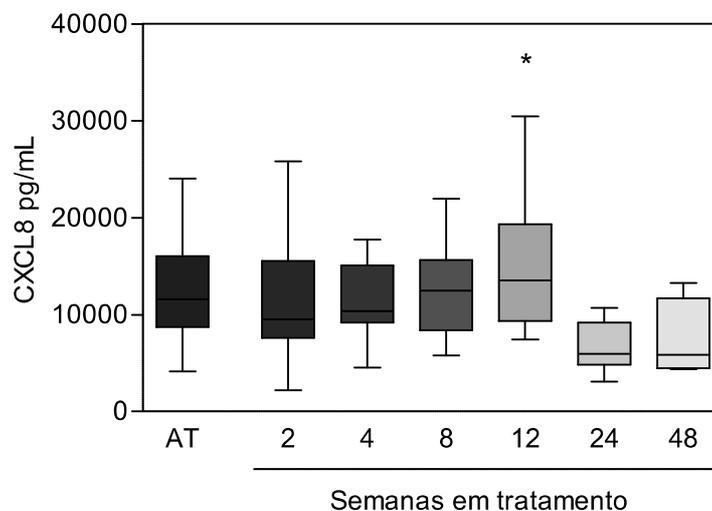


Gráfico 10: Análise dos níveis circulantes de CXCL8/IL8 de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em pg/mL. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 3.490,0 a 9.945,0 pg/mL, GIPB, 2015).

A análise dos níveis circulantes de CXCL/IL8 demonstrou um aumento significativo desse parâmetro na semana 12 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 10).

5.2.4 Níveis circulantes de CXCL9/MIG provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

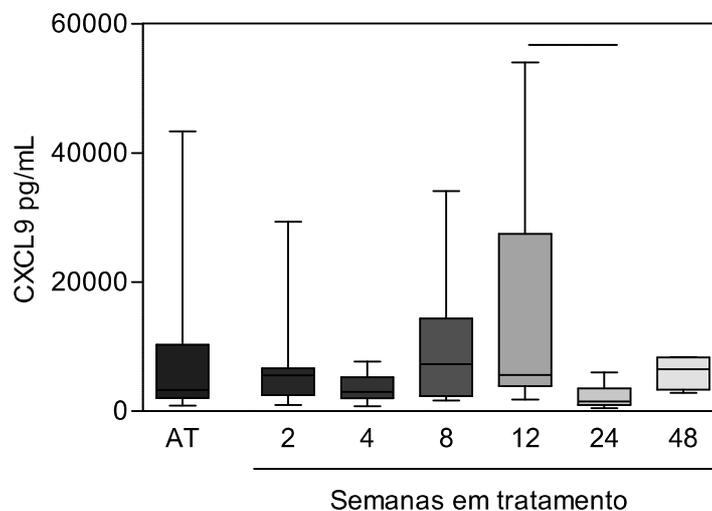


Gráfico 11: Análise dos níveis circulantes de CXCL9/MIG de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em pg/mL. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 355,0 a 1.114,0 pg/mL, GIPB, 2015).

A análise dos níveis circulantes de CXCL9/MIG demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro na semana 24 após o início do tratamento, quando comparado aos valores da semana 12 de tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas de tratamento e os valores encontrados antes do tratamento (Gráfico 11).

5.2.5 Níveis circulantes de CXCL10/IP-10 provenientes de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

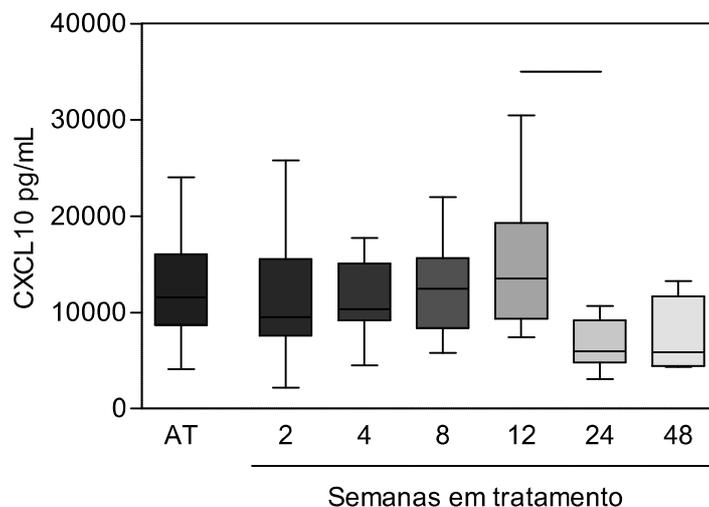


Gráfico 12: Análise dos níveis circulantes de CXCL10/IP-10 de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em pg/mL. Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 1.189,0 a 1.924,0 pg/mL, GIPB, 2015).

A análise dos níveis circulantes de CXCL10/IP-10 demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro na semana 24 após o início do tratamento, quando comparado aos valores da semana 12 de tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas de tratamento e os valores encontrados antes do tratamento (Gráfico 12).

5.3 TÓPICO III

Perfil de micropartículas circulantes antes e durante o tratamento triplo

5.3.1 Percentual de micropartículas circulantes originadas de ERITRÓCITOS (CD235a⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

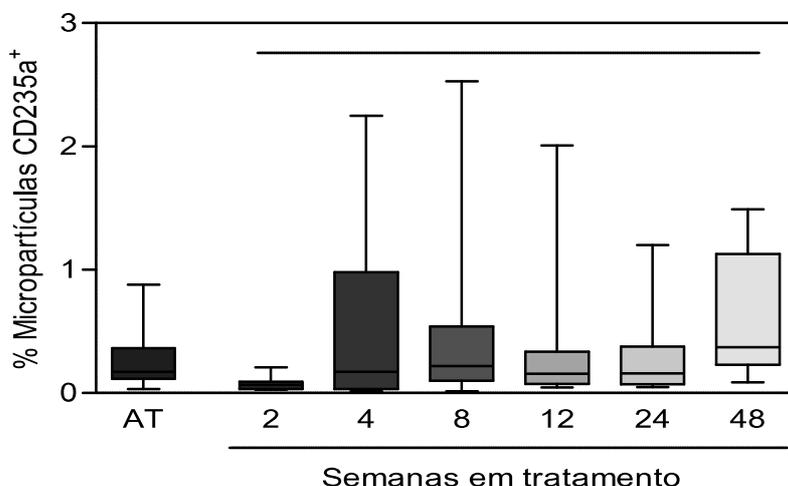


Gráfico 13: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de eritrócitos CD235a⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,2 a 1,0%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de eritrócitos demonstrou um aumento significativo desse parâmetro na semana 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores da semana 2 de tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas de tratamento e os valores encontrados antes do tratamento (Gráfico 13).

5.3.2 Percentual de micropartículas circulantes originadas de CÉLULAS ENDOTELIAIS (CD51⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

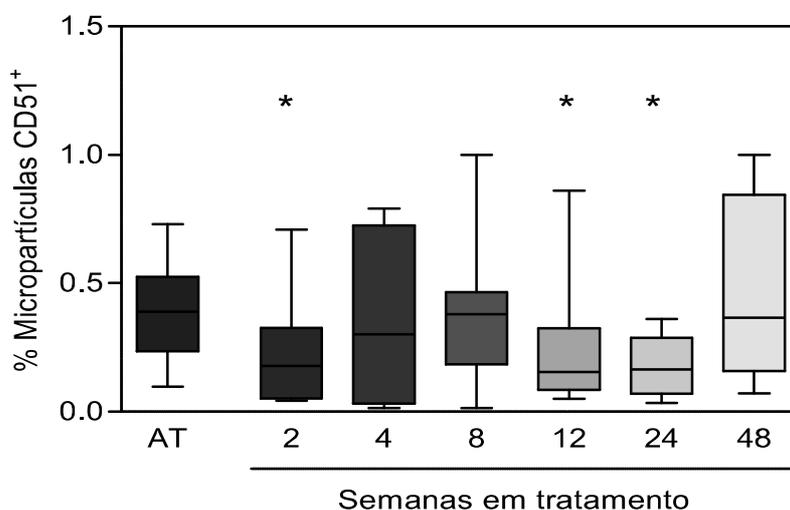


Gráfico 14: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de células endoteliais CD51⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,3 a 1,0%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de células endoteliais demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 2, 12 e 24 durante o tratamento, quanto comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 14).

5.3.3 Percentual de micropartículas circulantes originadas de PLAQUETAS (CD41a⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

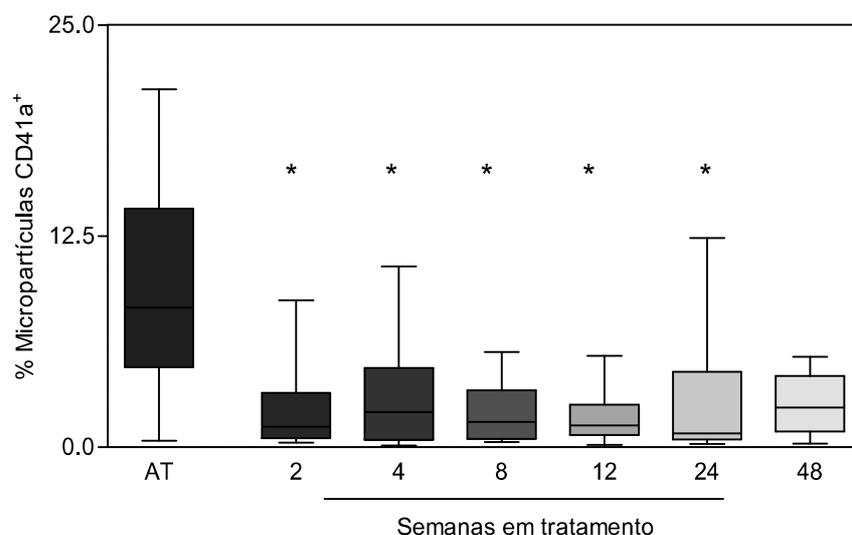


Gráfico 15: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de plaquetas CD41a⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 2,3 a 8,0%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de plaquetas demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 2 a 24 durante o tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 15).

5.3.4 Percentual de micropartículas circulantes originadas de LEUCÓCITOS (CD45⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

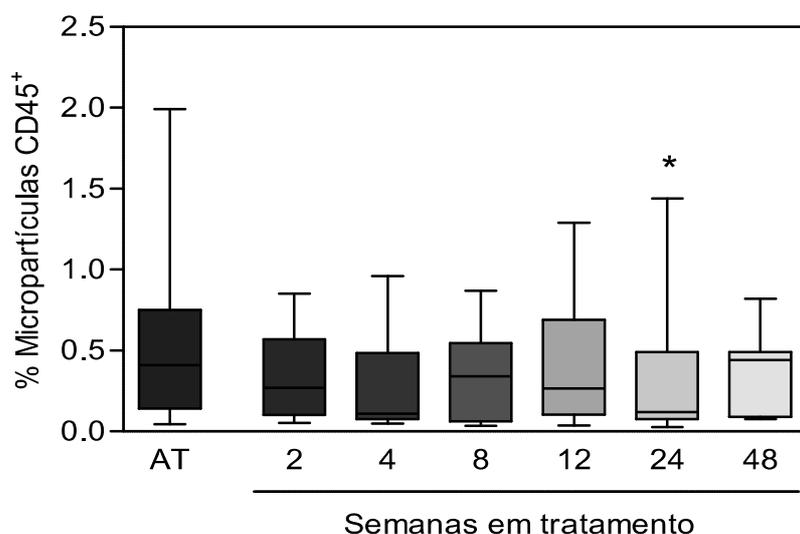


Gráfico 16: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de leucócitos CD45⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,2 a 1,0%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de leucócitos demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro na semana 24 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 16).

5.3.5 Percentual de micropartículas circulantes originadas de NEUTRÓFILOS (CD66b⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

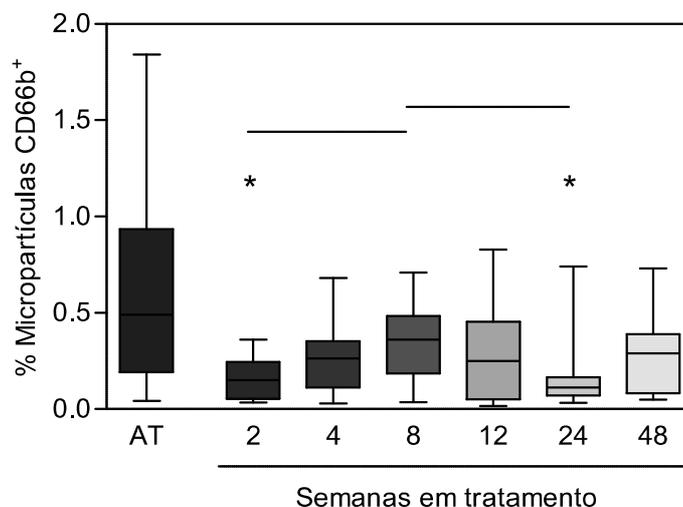


Gráfico 17: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de neutrófilos CD66b⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,2 a 0,8%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de neutrófilos demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 2 e 24 de tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Além disso, houve aumento significativo deste parâmetro na semana 8 após início do tratamento, quando comparado à semana 2 de tratamento e diminuição na semana 24, quando comparado à semana 8 de tratamento (Gráfico 17).

5.3.6 Percentual de micropartículas circulantes originadas de MONÓCITOS (CD14⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

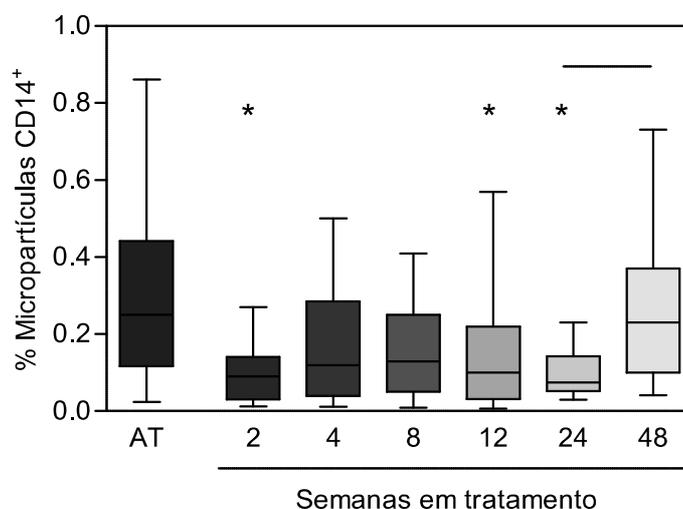


Gráfico 18: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de monócitos CD14⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,3a 0,9%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de monócitos demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 2, 12 e 24 de tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Além disso, houve aumento significativo deste parâmetro na semana 48, quando comparado à semana 24 de tratamento (Gráfico 18).

5.3.7 Percentual de micropartículas circulantes originadas de LINFÓCITOS T (CD3⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

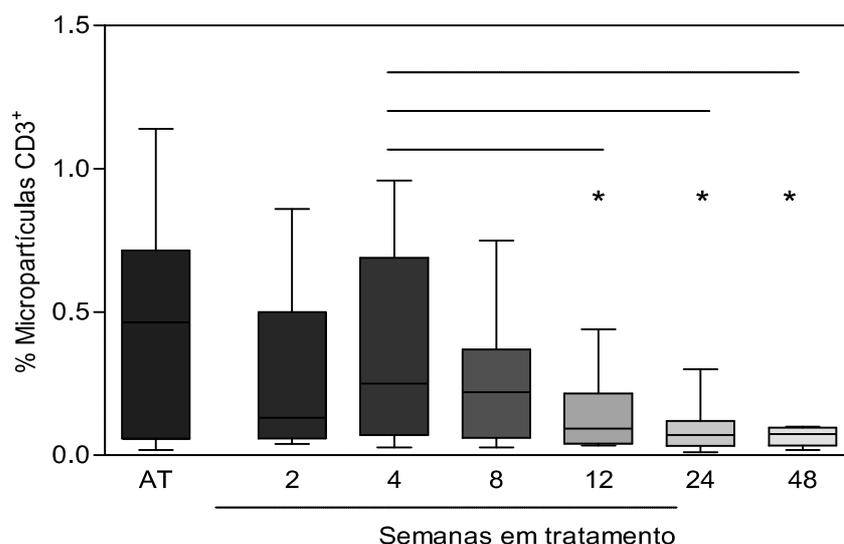


Gráfico 19: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de linfócitos T CD3⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,2 a 0,8%, GIPB 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de linfócitos T demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 12, 24 e 48 de tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Além disso, houve diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 12, 24 e 48, quando comparado à semana 4 de tratamento (Gráfico 19).

5.3.8 Percentual de micropartículas circulantes originadas de LINFÓCITOS T AUXILIARES (CD4⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

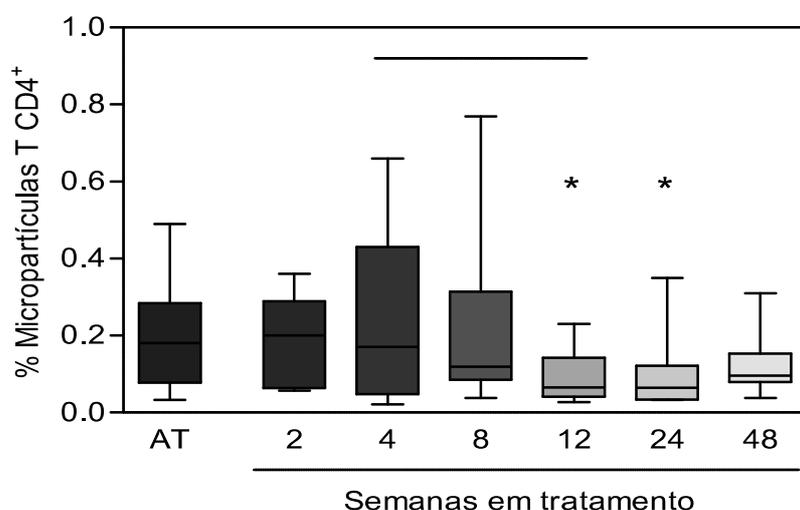


Gráfico 20: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de linfócitos T CD4⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,1a 0,6%, GIPB, 2015).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de linfócitos T auxiliares demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 12 e 24 de tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Além disso, houve diminuição significativa deste parâmetro na semana 12 após o início do tratamento, quando comparado à semana 4 de tratamento (Gráfico 20).

5.3.9 Percentual de micropartículas circulantes originadas de LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS/SUPRESSORES (CD8⁺) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

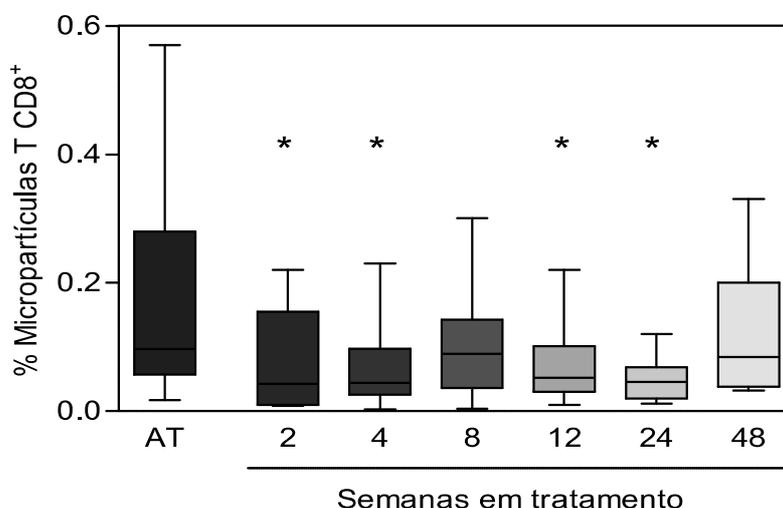


Gráfico 21: Análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de linfócitos T CD8⁺ de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante as semanas do tratamento triplo (2 a 48). Os resultados estão expressos em porcentagem (%). Os dados estão apresentados em gráficos de boxes que destacam os valores mínimo, 25%, 50%-mediana, 75% e máximo da população avaliada. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos, enquanto as diferenças entre dois grupos distintos em tratamento estão representadas por linhas (valores de referência do grupo controle: 0,1 a 0,6%, GIPB).

A análise do percentual de micropartículas circulantes originadas de linfócitos T citotóxicos/supressores demonstrou uma diminuição significativa desse parâmetro nas semanas 2, 4, 12 e 24 de tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as semanas avaliadas durante o tratamento (Gráfico 21).

5.4 TÓPICO IV

Perfil panorâmico de biomarcadores antes e durante o tratamento triplo

5.4.1 Análise do perfil panorâmico de biomarcadores de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

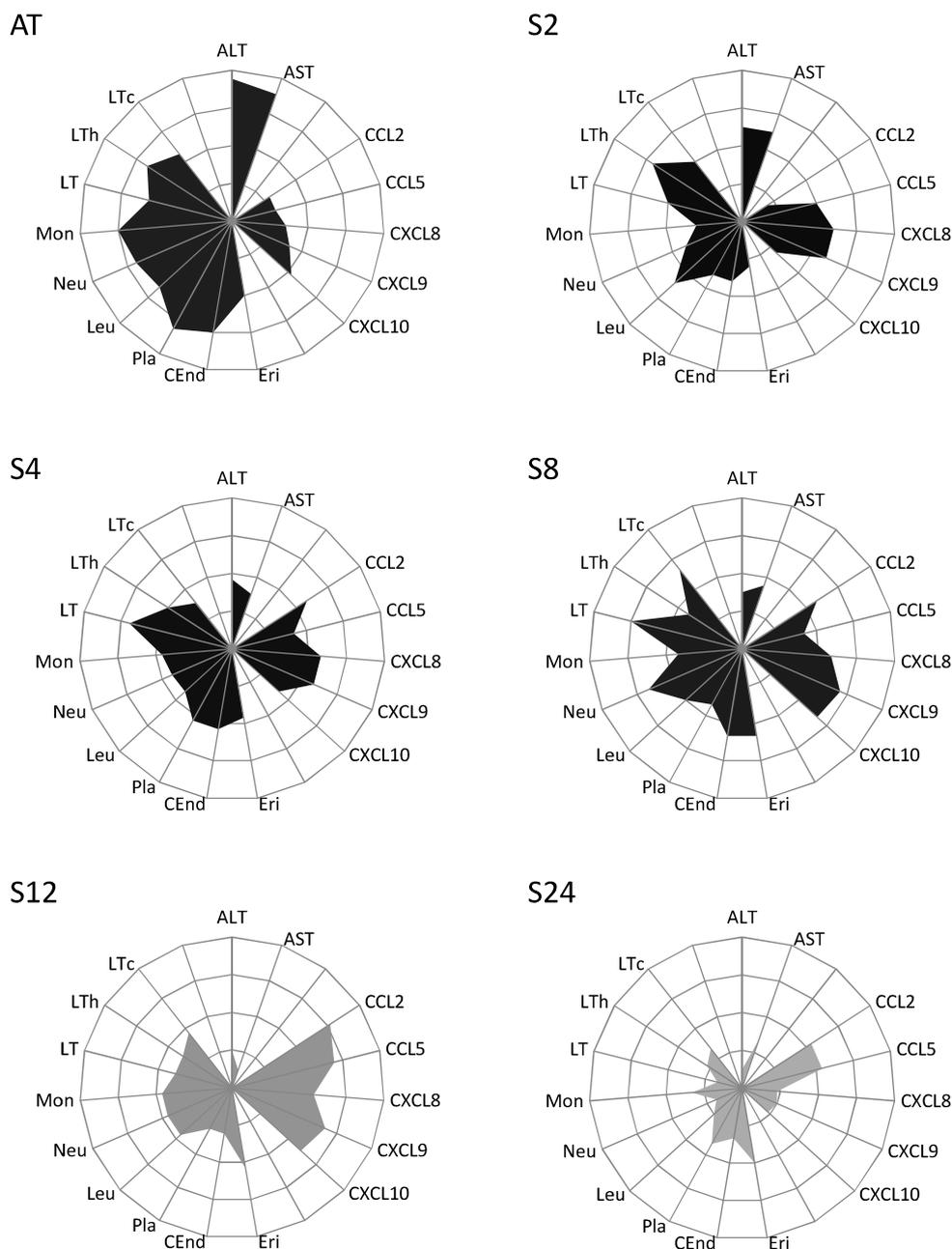


Gráfico 22: Análise do perfil panorâmico de enzimas hepáticas (alanina aminotransferase - ALT e aspartatoaminotransferase - AST), quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) e micropartículas circulantes derivadas de eritrócitos (Eri), células endoteliais (CEnd), plaquetas (Pla), leucócitos (Leu), neutrófilos (Neu), monócitos (Mon), linfócitos T (LT) e subpopulações de linfócitos T auxiliares (LTh) e citotóxicos/supressores (LTc), de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus HCV, antes (AT) e durante o tratamento (semanas 2 a 24 - S2 a S24, respectivamente). Os dados estão apresentados em gráficos de radar e expressos em percentual de indivíduos altos produtores dos parâmetros avaliados, segundo a mediana de valores do grupo total, incluindo os pacientes e o grupo controle, em escala variando de 0 a 100%.

A análise panorâmica dos dados demonstrou que há um aumento do percentual de altos produtores de micropartículas antes do tratamento e esse percentual começa a decair já na segunda semana do tratamento e retorna a níveis basais na semana 24 após o início do tratamento, Um resultado similar também é observado para as enzimas hepáticas (Gráfico 22). Já em relação às quimiocinas, há uma elevação do percentual de altos produtores ao longo do tratamento com normalização da frequência ao término do tratamento com frequência maior de CXCL9 e CXCL10 na semana 8 do tratamento e frequência maior de CCL2 e CCL5 mais tardiamente na semana 12 do tratamento (Gráfico 22).

5.4.2 Rede de interações biológicas entre os biomarcadores avaliados em pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante o tratamento triplo

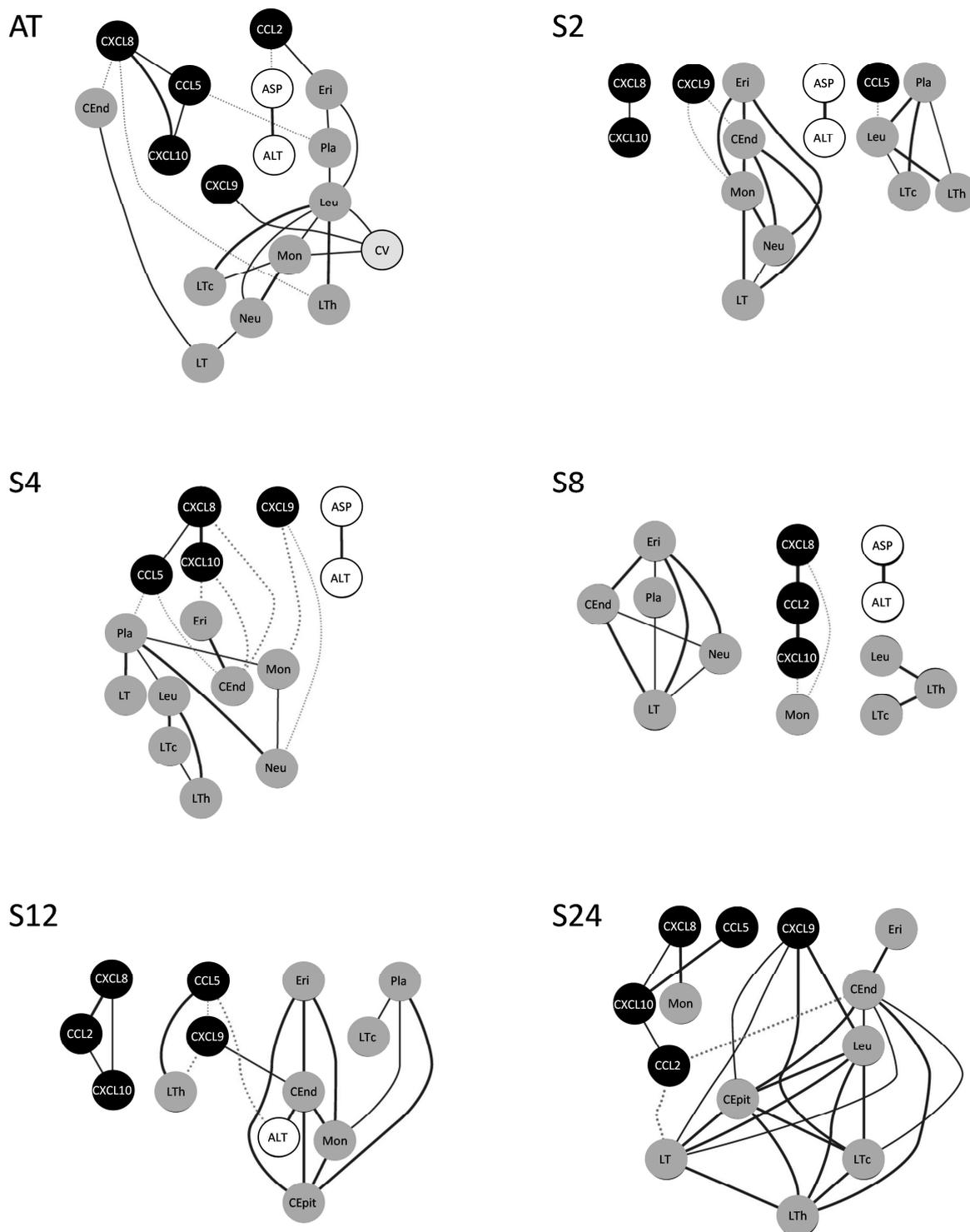


Figura 04: Rede de interações biológicas entre carga viral - nodo cinza claro (CV), enzimas hepáticas- nodos brancos (alanina aminotransferase - ALT e aspartatoaminotransferase - AST), quimiocinas- nodos pretos (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) e micropartículas circulantes - nodos cinza escuros derivadas de eritrócitos (Eri), células endoteliais (CEnd), plaquetas (Pla), leucócitos (Leu), neutrófilos (Neu), monócitos (Mon),

linfócitos T (LT) e subpopulações de linfócitos T auxiliares (LTh) e citotóxicos/supressores (LTc) de pacientes portadores da infecção crônica pelo vírus VHC, antes (AT) e durante o tratamento (semanas 2 a 24 - S2 a S24, respectivamente). Os dados estão apresentados em redes de correlações significativas ($p < 0,05$) positivas pela linha azul e negativas pela linha vermelha pontilhada. A força das correlações foi atribuída pelos valores de “r” e é ilustrada na figura como moderada ($0.36 > r < 0.67$) pelas linhas pontilhadas vermelhas e pela linha azul de espessura fina e como fortes ($r > 0.68$) pela linha azul de espessura grossa.

Avaliações adicionais que utilizam ferramentas de análise de sistemas biológicos revelaram que antes do tratamento houve o estabelecimento de uma rede complexa de interações e em sua maioria com correlações positivas, onde participam todos os parâmetros avaliados. Após o início do tratamento, houve a formação de microredes que se mantém até a semana 12 após o tratamento, voltando a formar uma rede única na semana 24 após o início do tratamento. Cabe ressaltar que as correlações negativas quando presentes envolvem sempre uma interação entre as quimiocinas e micropartículas e é na semana 4 durante o tratamento que essa característica torna-se mais evidente. Nesse contexto, a quimiocina CXCL9 se destaca, apresentando um tipo de interação bem distinto antes e depois do tratamento. Antes do tratamento ela está diretamente e exclusivamente correlacionada com carga viral. Após o início do tratamento, ela passa a se correlacionar inversamente com as micropartículas nas semanas 2 e 4. Por outro lado, correlaciona-se diretamente com as micropartículas nas semanas 12 e 24 durante o tratamento, onde no final do processo assume um papel central, comandando uma rede complexa de interações diretas com a grande maioria das micropartículas avaliadas ao longo do estudo.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo pretendeu caracterizar aspectos clínico-laboratoriais, perfil de quimiocinas e micropartículas circulantes em pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC antes e durante tratamento triplo, incluindo um inibidor de proteases (telaprevir ou boceprevir). Diante de constantes avanços no entendimento da infecção pelo VHC e mudanças no esquema terapêutico, torna-se necessário uma melhor compreensão da cinética de biomarcadores ao longo do tratamento e a sua importância na monitoração terapêutica e no alcance da resposta virológica sustentada pelos pacientes.

O perfil epidemiológico dos pacientes que participaram deste estudo assemelha-se ao descrito na literatura. Eles possuíam idade mediana de 59,5 anos e o tempo de infecção bem amplo com mediana de 34 anos (Tabela 05). Como a infecção por VHC decorre de forma assintomática e por longo período, o diagnóstico, em muitos casos, ocorre de forma tardia, o que poderia explicar medianas de idade dos pacientes, bem como seu tempo de infecção viral maiores (MARTINS, *et al*, 2011).

Todos os pacientes possuíam o genótipo tipo 1, e a subdivisão entre 1a em 30,0% e 1b em 75,0% dos pacientes (Tabela 05), foi similar ao observado em outros estudos (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). O modo de aquisição do vírus VHC (Tabela 06) foi predominantemente hemotransusão, equivalente a 35,0% dos pacientes, o que também está de acordo com os dados da literatura (MARTINS, *et al*, 2011). No presente estudo, não foi observada relação entre o uso prévio de álcool e tabaco com o decorrer do tratamento. Pacientes com agressão hepática elevada, que pode ser causada ou exacerbada devido ao uso de álcool, devem ser monitorados de forma rigorosa durante o tratamento devido ao maior risco de eventos adversos (HELBLING, B *et al*, 2006).

Os principais sinais e sintomas clínicos relatados pelos pacientes ao longo do tratamento (prurido cutâneo, fadiga, náusea, astenia, *rash*, vômito, hiporexia, insônia, prurido anal e fraqueza), já eram esperados, já que são descritos como possíveis efeitos colaterais na bula das medicações utilizadas; no caso do uso de telaprevir, espera-se esses sintomas em 10% dos casos (Tabela 08) (JANSEY, 2015; MERCK, 2011).

A RVS no presente estudo foi alcançada por 86,7% dos pacientes (Tabela 13), que é compatível ou maior do que a descrita em diversos estudos, onde a terapia com interferon-alfa convencional alcançava de 6-16% de RVS e a terapia com interferon-alfa convencional associado à ribavirina apresentava RVS de 34-42%. Outros estudos demonstraram que a terapia com interferon-alfa peguilado alcançava 39% de RVS, enquanto a terapia com interferon-alfa peguilado associado à ribavirina obtinha RVS de 60%. Com a adição dos

inibidores de proteases associados ao interferon-alfa peguilado e ribavirina, a taxa de RVS alcançava 80% (MANZANO-ROBLEDAMDEL C, 2015;BRASIL, 2013)

Dos dois pacientes que obtiveram resposta parcial (Tabela 07), com VHC-RNA positivo na 24ª semana de tratamento e subsequente suspensão do tratamento, um havia realizado dois tratamentos prévios com status não respondedor e o outro paciente havia realizado um tratamento anterior com status recidivante. O tratamento para pacientes recidivantes requer maior atenção de alguns aspectos, tais como, má adesão ao tratamento, intolerância ao tratamento, eventos adversos com necessidade de redução de medicamentos, reduções inadequadas nas doses dos esquemas terapêuticos (BRASIL, 2012). Os cinco pacientes que tiveram o tratamento suspenso devido a efeitos colaterais estavam distribuídos da seguinte forma: quatro pacientes estavam no primeiro tratamento e um paciente havia feito um tratamento anterior com status de recidivante. Os doze pacientes que obtiveram RVS se distribuíam desta forma: quatro pacientes estavam em seu primeiro tratamento; quatro pacientes em tratamentos anteriores apresentaram recidiva e, destes quatro, dois já haviam realizado dois tratamentos anteriores e dois realizaram um tratamento anterior; em três casos estas informações não foram disponíveis e em um caso o paciente havia realizado um tratamento anterior que foi suspenso devido a efeitos colaterais ao uso dos medicamentos.

A taxa de hemoglobina (Gráfico 01) de todos os pacientes antes do tratamento, apresentava-se acima do valor mínimo de referência, uma das condições para o seu início. No decorrer do tratamento, a taxa apresentou diminuição em relação aos valores antes do tratamento em todas as semanas, excluindo-se a semana 2. Na segunda semana de tratamento, os níveis de hemoglobina ainda permaneciam dentro dos valores de referência, com raras exceções, apresentando queda significativas nas semanas 8, 12 e 48 de tratamento. Esta queda já era esperada, devido a eventos adversos do uso da ribavirina. A ribavirina é absorvida por via oral e distribui-se no organismo, sofrendo concentração nas hemácias, este fato provoca a anemia hemolítica frequentemente observada em pacientes usuários do medicamento. A dosagem da ribavirina foi diminuída de acordo com os valores de hemoglobina, esperando-se um retorno dos valores de hemoglobina a concentrações similares aquelas apresentadas antes do tratamento. Nos casos em que os valores de hemoglobina permaneciam reduzidos mesmo com a diminuição da dosagem de ribavirina foi utilizada a eritropoetina, que é uma glicoproteína que apresenta como função a regulação da eritropoese. O uso desse medicamento não interferiu nas análises da hemoglobina, já que não foram encontradas diferenças significativas nas análises, quando excluídos ou não os pacientes (05/20 - 25%) que utilizaram eritropoetina durante o tratamento (JANSEY, 2015; MERCK, 2011; PRICE *et al.*, 2014; SMOLIĆ *et al.*, 2013).

A contagem global de leucócitos (Gráfico 02) apresentou declínio durante o tratamento nas semanas 4, 8, 12, 24 e 48 em comparação aos dados antes do tratamento. Perfil semelhante foi encontrado para a contagem do número absoluto de neutrófilos e linfócitos. Esses achados podem ser explicados como um dos efeitos colaterais do uso da terapia com interferon-alfa peguilado. Os interferons efetuam sua ligação aos receptores específicos presentes na superfície celular, iniciando um caminho complexo de sinalização intracelular e rápida ativação da transcrição gênica. Os genes estimulados pelo interferon modulam muitos efeitos biológicos, incluindo a inibição da replicação viral em células infectadas, inibição da proliferação celular e imunomodulação, o que poderia explicar a queda do número destas células em pacientes que utilizaram filgrastim. O uso desse medicamento não interferiu nas análises dos leucócitos, já que não foram encontradas diferenças significativas nas análises, quando excluídos ou não os pacientes que fizeram uso dessa medicação (04/20 - 20%) (JANSEY, 2015; MERCK, 2011; PRICE *et al.*, 2014; SMOLIĆ *et al.*, 2013).

A contagem de plaquetas (Gráfico 05) apresentou um declínio na semana 4 de tratamento em comparação aos valores encontrados antes do tratamento. A redução do número de plaquetas também pode ser explicada devido aos efeitos colaterais das medicações (JANSEY, 2015; ROCHE, 2014).

As aminotransferases ALT e AST (Gráfico 06 e Gráfico 07), marcadores consagrados de agressão hepática, apresentavam-se em níveis elevados antes do tratamento, e apresentaram declínio progressivo ao longo do tratamento, chegando a níveis dentro dos valores de referência ao término do tratamento, sugerindo que o desaparecimento da circulação viral tenha contribuído para amenizar os danos hepáticos causados por sua presença e multiplicação nos hepatócitos (JANSEY, 2015; MERCK, 2011; PRICE *et al.*, 2014; SMOLIĆ *et al.*, 2013).

Em infecções crônicas por VHC é observado um aumento da frequência de MPs circulantes (Korneketal, 2012). De forma geral, no presente estudo, as MPs apresentaram um declínio no decorrer do tratamento, o que sugere um provável processo de imunomodulação da resposta imune com a redução da carga viral. A consequente diminuição da interação do vírus com componentes do sangue induziria uma menor formação de MPs.

Recentemente, as MPs têm sido implicadas como biomarcadores potenciais específicos de doença e de resposta clínica ao tratamento. Além de preditores de resposta ao tratamento, as MPs podem se apresentar como potenciais biomarcadores para detecção precoce de várias doenças como câncer (JULICH *et al.*, 2014). De forma geral, os nossos resultados demonstraram um aumento da frequência de MPs antes do tratamento e uma

diminuição ao longo do tratamento de MPs circulantes CD4⁺ e CD8⁺ (Gráfico 20 e Gráfico 21), o que corrobora com a literatura, já que Kornek e colaboradores em 2012 demonstraram que níveis aumentados de expressão de micropartículas CD4⁺ e CD8⁺ estão relacionados à severidade da doença.

Durante as doenças crônicas hepáticas, as células estreladas (componentes da matriz extracelular em doenças crônicas do fígado), atuam no recrutamento das células do sistema imune, através da expressão de quimiocinas. Estas quimiocinas, tais como, CXCL9 e CXCL10 apresentam-se aumentadas em infecções crônicas por HCV (BRASS & BREENDOFERR, 2014).

As quimiocinas CCL2 e CCL5 (Gráfico 08 e Gráfico 09) que são quimioatraentes de monócitos e linfócitos T inflamatórios, respectivamente, apresentaram um aumento significativo na semana 12, demonstrando um papel de destaque tipos celulares em resposta à infecção viral.

Por outro lado, as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 (Gráfico 11 e Gráfico 12) presentes em processos inflamatórios, bem como em infecções virais, apresentaram queda mais tardia durante o tratamento, com redução significativa na semana 24, quando comparada à semana 12 de tratamento, o que sugere um processo de diminuição da agressão hepática e resolução da infecção.

Uma associação interessante entre a frequência de MPs e os níveis de quimiocinas, particularmente CXCL9 e CXCL10 (Gráfico 11 e Gráfico 12), pôde ser observada na semana 24 ao final do tratamento. Houve uma redução relevante desses parâmetros em comparação à semana 12 de tratamento. Além disso, ao final do tratamento, esses parâmetros apresentaram uma complexa rede de interações biológicas que se correlacionaram em sua maioria de forma direta. Essa rede é comandada por CXCL9, que tem seus níveis modulados ao final do tratamento, evidenciando o papel central desse biomarcador na cinética de modulação da produção de MPs ao longo do tratamento. Provavelmente, o clearance viral também tem uma participação efetiva nesse processo, uma vez que antes do tratamento, CXCL9 é a única quimiocina que se correlaciona diretamente com carga viral. Recentemente, trabalho publicado por Zeremskie e colaboradores em 2015, objetivou identificar quimiocinas como prováveis biomarcadores de RVS durante o tratamento triplo contra infecção pelo VHC. O estudo avaliou a expressão de CXCL10 em quinze pacientes tratados com terapia tripla, utilizando o telaprevir como inibidor de proteases, e demonstrou que a expressão precoce desta quimiocina não se correlacionava com RVS.

As ferramentas utilizadas de análise de sistemas biológicos (Gráfico 22) nos auxiliaram a caracterizar melhor o perfil cinético dos biomarcadores de forma panorâmica.

Essa abordagem demonstrou de maneira visual o declínio dos marcadores de agressão hepática, dos níveis de quimiocinas e da frequência de micropartículas no decorrer do tratamento, sugerindo que o tratamento promove um ambiente favorável para a resposta imune mais eficaz contra o vírus VHC, que está associado com o desencadeamento de mecanismos imunomoduladores que prevalecem ao final do tratamento.

7 CONCLUSÃO

Houve um declínio dos marcadores de agressão hepática, dos níveis de quimiocinas e da frequência de micropartículas no decorrer do tratamento, sugerindo, em síntese, que o tratamento e a redução ou eliminação do vírus promove um ambiente imunomodulador com retorno da resposta imunológica dentro dos padrões esperados na ausência da infecção viral. Para grande maioria dos pacientes que terminaram o tratamento, esse panorama está associado ao alcance de uma resposta virológica sustentada e, conseqüentemente, ao sucesso do tratamento triplo.

8 ANEXOS

8.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Número do protocolo:

Prezado(a) Sr(a). _____

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

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

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

QUAL É A FINALIDADE DO ESTUDO?

A finalidade deste estudo é obter um melhor entendimento da associação do vírus causador da hepatite C com o sangue e seus componentes, ou seja, suas células, como as hemácias e as plaquetas, e investigar e implantar um método de monitoração de carga viral mais sensível que o método convencional utilizado. Entender o impacto dessa interação na doença dos pacientes VHC positivos antes, durante e após o tratamento será muito importante para orientar os médicos sobre como tratar melhor os pacientes no futuro.

O estudo será realizado a partir de amostras de sangue oriundas do (a) Sr(a) em momentos distintos do tratamento da hepatite C (pré-tratamento, durante e ao término do tratamento) realizado conforme o protocolo do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de

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

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

EU PRECISO PARTICIPAR?

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

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

Com o consentimento, o(a) Sr(a). dará a sua permissão para que amostras de sangue sejam coletadas e que informações específicas contidas no seu prontuário médico sejam extraídas. Estas informações serão confidenciais e anotadas pela pesquisadora principal do estudo e serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes visando o melhor entendimento dos fatores envolvidos na pesquisa. É importante que o(a) Sr(a). saiba que a sua identidade será preservada e que as anotações não serão identificadas com o seu nome.

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

O pesquisador responsável ou autoridades regulatórias podem encerrar o estudo ou a sua participação no estudo, a qualquer momento, sem o seu consentimento. Contudo, o seu

tratamento não será jamais interrompido por este motivo e o(a) Sr(a). continuará com a mesma assistência médica inicial. Portanto, a interrupção do tratamento só acontecerá por motivos médicos, conforme decisão do seu médico, e não por causa dessa pesquisa.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

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

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

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

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

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

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

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

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

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

E QUANTO À CONFIDENCIALIDADE?

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

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

- Utilizados para outras pesquisas atuais ou futuras envolvendo o tratamento e controle da hepatite C, condições de saúde relacionadas, ou para outra pesquisa relevante de saúde;

- Utilizados em publicações sobre este estudo, mas eles permanecerão codificados. A sua identidade não será revelada em qualquer compilação, relatório de estudo ou publicação a qualquer momento.

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

E QUANTO AOS CUSTOS?

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

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

CONTATO PARA OUTRAS INFORMAÇÕES

O(a) Sr(a). receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado. Se tiver dúvidas sobre qualquer aspecto deste estudo, pode solicitar outras informações, a qualquer momento durante o estudo à **Dra. Rosângela Teixeira no telefone (fax) (031) 3409 9748. Se o(a) Sr(a). ou seu representante tiver qualquer dúvida sobre os seus direitos como paciente, relacionadas a este estudo que não forem solucionados pela coordenadora do estudo, poderá também contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG que é o órgão que regulamenta a realização de pesquisas na UFMG, no endereço Av. Pres. Antônio Carlos, 6627- Unidade administrativa II – 2º andar – sala 2005. CEP: 31270-901 – BH-MG telefax (031) 3409-4592 - email:coep@prpq.ufmg.br**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Li o termo de consentimento livre e esclarecido para este estudo “Fisiopatologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite”.

2. Recebi explicações sobre a finalidade, duração e possível benefício do estudo e sobre o que é esperado que eu faça.
Minhas perguntas foram respondidas de maneira satisfatória.

3. Concordo livremente em participar deste estudo.

4. Entendo que a minha participação no estudo é voluntária e que sou livre para me retirar a qualquer momento, sem dar qualquer razão, sem que minha assistência médica ou os meus direitos legais sejam afetados.

5. Monitores e coordenadores de pesquisa, Comitê de Ética em Pesquisa ou autoridades regulatórias podem querer examinar os meus prontuários médicos para verificar as informações coletadas.

6. Ao assinar este documento, dou permissão para coleta de amostras de sangue e análise dos meus dados no prontuário médico do Hospital das Clínicas da UFMG.

7. Dou o meu consentimento para o uso, armazenamento e retenção dos meus dados pessoais para as finalidades do estudo descrito neste documento.

Nome do paciente

Assinatura

Data

Nome do representante (se aplicável)

Assinatura

Data

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

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

Nome do médico

Assinatura

Data (deve ser a mesma data)

Testemunha imparcial

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

Nome da testemunha*

Assinatura*

Data

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

9 REFERÊNCIAS

ABBAS, AK; LICHTMAN, AH; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição. Editora Campos, 2008.

AN algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *The METAVIR Cooperative study Group.Hepatology*, 15, 289-293, 1996.

BRASS, A; BRENNDÖRFER, ED. Role of Chemokines in Hepatitis C Virus-Mediated Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences Int. J. Mol. Sci.*, 2014, 15, 4747-4779.

BISCEGLIE, AMD. Hepatitis C Seminar. *The Lancet*, 5, p.351-5, 1998.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 20, de 25 de julho de 2012**. Torna pública a decisão de incorporar os inibidores de protease telaprevir e boceprevir para tratamento da hepatite crônica C no Sistema Único de Saúde (SUS).

BRITO, VO *et al.* Infecção pelo HIV, hepatites B e C e sífilis em moradores de rua, São Paulo, *Ver. Saúde Pública*, v. 41, suppl. 2, p. 47-56, 2007.

BUSEK, S; OLIVEIRA, GC. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil, *Genet Mol Res*, v. 2, n.1, p.117-123, Mar. 2003.

CAMPIOTTO *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, p. 1,41-49, 2005.

CARVALHO, GB *et al.* HIV and infections of similar transmission patterns in a drug injectors community of Santos, Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirl.*, v. 12, n. 1, p. 84-92,1996.

CHENEY, CP; CHOPRA, S; GRAHAM, C. Hepatitis C. *Infectious Disease Clinics of North America*. LOCAL DA PUBLICAÇÃO, 14, p. 633-67, 2000.

CHOO, QL *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v. 244, n.4902, p. 359-62,1989.

COMBES, V; COLTEL, N; ALIBERT, M; VAN ECK, M; RAYMOND, C; JUHAN-VAGUE, I; GRAU, GE; CHIMINI, G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol* 2005 Jan; 166(1):295-302.

COOPER, S *et al.* Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999;10:439-449.

COUPER, KN; BARNES, T; HAFALLA, JC; COMBES, V; RYFFEL, B; SECHER, T; GRAU, GE; RILEY, EM; DE SOUZA, JB. (2010) Parasite-derived plasma microparticles

contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS pathogens*. 6, e1000744.

CRAZI, A; PAWLOTSKY, JM; WEDEMEYER, H *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Hepatol* 2011;55(2):245-264.

DI BISCIGLIE, AM; GOODMAN, ZD; ISHAK, KG. Long-term clinical and histopathological follow up of chronic post-transfusion hepatitis. *Hepatology* 1991;14:969-74.

DUSTIN, LB; RICE, CM. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol*, 2007; 25, 71-99.

GEORGE, N; MCMANUS, M; THOI, LL; REIMANN, TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood Out* 2011;834-840.

GHANY, MG *et al.* Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1335-74. doi: 10.1002/hep.22759.

Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005

HELBLING, B *et al.* HCV- related advanced fibrosis/cirrhosis: randomized controlled trial of pegulated interferon alpha-2a and ribavirin. *J. Viral Hepat.*, v. 13, p762-769, 2006.

Estrutura viral HCV. Disponível em: <<http://www.niv.com.br>>. Acesso em: 01/06/2015.

HOOFNAGLE, JH. Management of hepatitis C: current and future perspectives. *J Hepatol*, 1999; 31: 264-8.

INCIVO™: telaprevir. São Paulo: Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. Farm. Resp.: Marcos R. Pereira – CRF/SP nº 12.304. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.janssen-cilag.com.br/bulas/incivo%E2%84%A2>

JULICH, H; WILLMS, A; LUKACS-KORNEK, V *et al.* Extracellular Vesicle Profiling and Their Use as Potential Disease Specific Biomarker. *Frontiers in Immunology*. 5, p. 413, 2014.

JY, W; HORSTMAN, LL; ARCE, M; AHN, YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med*, 119, p. 334-45, Abr.1992.

KEVIN, PVO *et al.* Poor Sustained Virological Response in a Multicenter Real-Life Cohort of Chronic Hepatitis C Patients Treated with Pegylated Interferon and Ribavirin plus Telaprevir or Boceprevir. *Digestive Diseases and Sciences*. April 2015, Volume 60, Issue 4, pp 1045-1051

KLEINER, DE. The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope. *Semin. Liver Dis.*, v. 25, p. 52-64, 2005.

KORNEK, M; LYNCH, M; MEHTA, SH *et al.* 2012. Circulating Microparticles as Disease-Specific Biomarkers of Severity of Inflammation in Patients with Hepatitis C or Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2012 August; 143(2): 448–458.

- LAUER, GM; WALKER, BD. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med*, v. 345, n. 1, p. 41-52, 2001.
- MANZANO-ROBLEDA, MDEL C; ORNELAS-ARROYO, V; BARRIENTOS-GUTIÉRREZ, T *et al.* Boceprevir and telaprevir for chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. A systematic review and meta-analysis. *Ann Hepatol*. 2015 Jan-Feb;14(1):46-57.
- MARTINS, T; NARCISO-SCHIAVON, JL; SCHIAVON, LL. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev. Associa. Med. Bras.*, v. 57, n. 1, p. 107-112, 2011.
- MAUSE, SF; WEBER, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*, p. 107(9):1047-57, Out. 2010.
- Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda, 2011. Bula da Ribavirina.
- OLIVEIRA, GC; CARMO, RA; ROCHA, MOC *et al.* Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion*, v. 39, n. 11-12, p. 1194-199, Nov-Dec. 1999.
- PATTANAPANYASAT, K; GONWONG, S; CHAICHOMPOO, P *et al.* Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia. *Br J Haematol*, p. 136: 462-71, Fev. 2007.
- PRICE, JC *et al.* Recommendation for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons Born during 1945-1965. CD, vol 6. N. 4, 2012.
- PRICE, JC *et al.* Effectiveness of Telaprevir and Boceprevir Triple Therapy for Patients with Hepatitis C Virus Infection in a Large Integrated Care Setting. *Digestive Diseases and Sciences*. December 2014, Volume 59, Issue 12, pp 3043-3052
- REHERMANN, B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin liver Dis* 2000;20:127-141.
- REHERMANN, B; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology* 2005;5:215-229.
- ROZMYSŁOWICZ, T; MAJKA, M; KIJOWSKI, J; MURPHY, SL; CONOVER, DO; PONCZ, M; RATAJCZAK, J; GAULTON, GN; RATAJCZAK, MZ. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS* 2003;17(1):33-42.
- ROCHE, 2014. Bula do interferon peguilado.
- SCOTT, S; PENDLEBURY, SA; GREEN, C. Lipid organization in erythrocyte membrane microvesicles. *Biochem J*, p. 224: 285-90 Nov. 1984.
- SATTA, N; TOTI, F; FEUGEAS, O *et al.* Monocyte Vesiculation Is a Possible Mechanism for Dissemination of Membrane-Associated Procoagulant Activities and Adhesion Molecules After Stimulation. *J Immunol*, p. 153: 3245-55, 1994.

FAHEY, S *et al*, 2014. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cellular & Molecular Immunology* (2014) 11, 25–40.

SMOLIĆ, M; SMOLIĆ, R; VCEV, A. Management of side effects induced by antiviral therapy for chronic hepatitis infection]. *Acta Med Croatica*. 2013 Oct;67(4):383-7.

THIO, C. Host genetic factors and antiviral immune responses to HCV. *Clin Liver Diseases* 2008;12(3):713-727.

VAN DER HEYDE, HC; GRAMAGLIA, I; COMBES, V; GEORGE, TC; GRAU, GE. Flow cytometric analysis of microparticles. *Methods Mol Biol* 2011;699:337-54.

ZEREMSKI, M; DIMOVA, RB; BENJAMIN, S *et al*. Intrahepatic and Peripheral CXCL10 Expression in Hepatitis C Virus-Infected Patients Treated With Telaprevir, Pegylated Interferon, and Ribavirin. *J Infect Dis*. 2015 Jun 1;211(11):1795-9

ZLOTNIK, A; YOSHIE, O. The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*. 2012;36(5):705-716.

HUO, Y *et al*, Efficacy of Folic Acid Therapy in Primary Prevention of Stroke Among Adults With Hypertension in China: The CSPPT Randomized Clinical Trial. *The journal of the American Medical Association*. April 7, 2015, Vol 313, No. 13 .