



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA BEATRIZ DA SILVA SACERDOTE

**OCORRÊNCIA DO ANTICORPO ANTI-ANÉIS E BASTÕES ANTES E DEPOIS DO  
TRATAMENTO DA HEPATITE C COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO  
DIRETA**

Recife  
2018

ANA BEATRIZ DA SILVA SACERDOTE

**OCORRÊNCIA DO ANTICORPO ANTI-ANÉIS E BASTÕES ANTES E DEPOIS DO  
TRATAMENTO DA HEPATITE C COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO  
DIRETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de concentração:** Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Arteiro Filgueira.

Recife

2018

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

S119o Sacerdote, Ana Beatriz da Silva.  
Ocorrência do anticorpo anti-anéis e bastões antes e depois do tratamento da hepatite c com os novos antivirais de ação direta / Ana Beatriz da Silva Sacerdote. – 2018.  
84 f.: il.; tab.

Orientador: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Hepatite C. 2. Autoanticorpos. 3. Ribavirina. 4. Antivirais. I. Lopes Neto, Edmundo Pessoa de Almeida. (Orientador). II. Título.

610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-103)

ANA BEATRIZ DA SILVA SACERDOTE

**OCORRÊNCIA DO ANTICORPO ANTI-ANÉIS E BASTÕES ANTES E DEPOIS DO  
TRATAMENTO DA HEPATITE C COM OS NOVOS ANTIVIRAIS DE AÇÃO  
DIRETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 27/04/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto.(Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Paulo Sérgio Ramos Araújo (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Diniz Lopes Marques (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Andréa Dória Batista (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho A meus pais, meu irmão e meu marido, meus maiores fãs e também meus maiores ídolos, pelo amor, pelo apoio e pela felicidade que me proporcionam todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem o incentivo e apoio de diversas pessoas e instituições. Por isto relato aqui os meus agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edmundo Lopes, pela paciência e estímulo na realização deste projeto;

À minha coorientadora, Prof. Dra. Norma Arteiro pelos ensinamentos e incentivo nesses 6 anos da minha formação;

À Dra. Andréa Dória pela ajuda na avaliação e condução dos pacientes do estudo;

À Joelma, Isabella, Carol e Izolda pela companhia e ajuda durante a coleta dados;

Aos meus professores da UFPE, preceptores da Clínica Médica e Gastroenterologia pela participação na minha formação profissional e ao Hospital das Clínicas pela disponibilidade como campo de pesquisa;

Aos funcionários e professores da Pós Graduação em Ciências da Saúde pela dedicação ao ensino e incentivo durante a pós graduação;

Aos colegas e amigos do mestrado de 2016 pela ajuda e amizade nesses dois anos;

## RESUMO

**Introdução:** O vírus da Hepatite C (HCV) causa elevada morbimortalidade e se associa a manifestações extra-hepáticas autoimunes. Recentemente, um anticorpo denominado anti-anéis e bastões (anti-RR) tem despertado interesse por ocorrer quase exclusivamente em pacientes com HCV que utilizaram alfa-interferon peguilado (PEG) e ribavirina (RBV), sendo geralmente detectado em cerca de 25% desses pacientes. Em estudos *in vitro*, apenas a RBV foi capaz de induzir esses anticorpos, provavelmente por sua capacidade de inibir irreversivelmente a IMPDH2, que é o antígeno dos anti-RR. Em estudos *in vivo*, seu surgimento só foi comprovado no uso associado da RBV e PEG. Atualmente, novos antivirais de ação direta (DAAs) permitem a cura da hepatite C sem uso de PEG, com uso da RBV em casos selecionados. O objetivo desse estudo foi descrever a ocorrência do anticorpo anti-anéis e bastões em pacientes com hepatite crônica pelo HCV antes e depois do tratamento com os novos antivirais de ação direta. **Métodos:** Entre 2016 e 2017, 70 pacientes submetidos ao tratamento com os novos DAAs foram entrevistados e tiveram amostras de soro coletadas antes do seu tratamento. Destes, 52 tiveram amostras coletadas também após 12 semanas de uso dessas medicações. Foi pesquisado o anti-RR através de imunofluorescência indireta. **Resultados:** O anti-RR foi detectado em 16 pacientes antes uso dos DAAs, sendo que todos os positivos haviam sido previamente expostos à PEG e RBV. Na amostra após 12 semanas, 14 pacientes foram positivos. O anti-RR surgiu em três pacientes após o início dos DAAs. Dois desses pacientes estavam em uso de ribavirina associada ao esquema. Dos 70 pacientes, 34 haviam realizado tratamento prévio para o HCV. Tratamento prévio com PEG e RBV, tempo de uso de RBV e uso de telaprevir estiveram relacionados de forma significativa com o surgimento do anticorpo na amostra pré-tratamento. **Conclusão:** Observou-se a presença do anti-RR antes do uso dos novos DAAs em quase metade dos pacientes que tinham tratamento prévio contra o HCV. Após as 12 semanas de uso dos novos antivirais, esse anticorpo tornou-se positivo em 5,7% dos pacientes. A realização de terapia prévia contra a hepatite C e o tempo de uso de RBV nessa terapia prévia estiveram fortemente relacionados à presença do anticorpo.

**Palavras-chave:** Hepatite C. Autoanticorpos. Ribavirina. Antivirais.

## ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C virus (HCV) causes high morbidity and mortality, and is associated with autoimmune extrahepatic manifestations. Recently, an antibody called anti-rods and rings (anti-RR) has been reported almost exclusively in hepatitis C patients treated with interferon- $\alpha$  (IFN) and ribavirin (RBV) combination therapy, being generally detected in 25% of these patients. In *in vitro* studies, only RBV was able to induce these antibodies, probably because of its ability to irreversibly inhibit IMPDH2, which is the antigen of anti-RR. In *in vivo* studies, its emergence has only been detected in the associated use of RBV and PEG. Currently, new direct-acting antivirals (DAAs) allow hepatitis C cure without the use of PEG, with the use of RBV in selected cases. The aim of this study is to describe the occurrence of anti-rods and rings antibody in patients with chronic HCV infection, before and after treatment with the new DAAs. Methods: From 2016 to 2017, 70 patients undergoing treatment with the new DAAs were interviewed and had serum samples collected prior to their treatment. Of these, 52 had samples collected also after 12 weeks of use these medications. The anti-RR was investigated through indirect immunofluorescence. Results: Anti-RR was detected in 16 patients (22.8%) prior to the use of DAAs, all of which were previously exposed to PEG and RBV. In the sample after 12 weeks, 14 patients were positive. Anti-RR appeared in three patients after the exposure to DAAs. Two of these patients were using ribavirin associated with DAAs. Of the 70 patients, 34 had undergone previous treatment for HCV. Prior treatment with PEG and RBV, longer exposure time to ribavirin and use of telaprevir were significantly related to the appearance of the antibody in the pretreatment sample. In the sample after 12 weeks, prior use of RBV was significant, but not the RBV use associated with DAAs Conclusion: The presence of anti-RR before the use of the new DAAs was observed in almost half of the patients with previous treatment against HCV. After 12 weeks of use of the new antivirals, this antibody became positive in 5.7% of the patients. Previous therapy against hepatitis C and the time of use of RBV in this previous therapy were strongly related with the emergence of this antibody.

Keywords: Chronic hepatitis C. Autoantibodies. Ribavirin. Antiviral agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Anticorpo Anti-anéis e bastões vistos na imunofluorescência indireta.....	18
Quadro 1 –	Principais estudos descrevendo a ocorrência dos anti-anéis e bastões publicados no MEDLINE entre 2012 e 2017 .....	23
Figura 2 –	Fluxograma para operacionalização do estudo dos anticorpos anti-anéis e bastões em pacientes com hepatite C em uso novos DAAs.....	29
Quadro 2 –	Esquemas terapêuticos utilizados pela população do estudo dos anticorpos anti-anéis e bastões em pacientes com hepatite C crônica em uso dos novos DAAs.....	30
Figura 3 –	Exames de imunofluorescência indireta evidenciando os anticorpos anti-anéis e bastões em paciente do presente estudo.....	33
Quadro 3 –	Definição das variáveis adotadas no estudo dos anticorpos anti-anéis e bastões em pacientes com hepatite C crônica em uso dos novos DAAs .....	34
Figura 4 –	Diagrama da população estudada.....	43
Gráfico 1 –	Títulos dos anticorpos anti-anéis e bastões dos 16 pacientes com hepatite C crônica tratados com os novos antivirais que apresentaram o anticorpo na amostra pré-tratamento) .....	48
Quadro 4 –	Características dos três pacientes em que ocorreu surgimento dos anticorpos anti-anéis e bastões após 12 semanas de tratamento com os novos antivirais (DAAs) ....2018 .....	49
Gráfico 2 –	Títulos dos anticorpos anti-anéis e bastões dos 14 pacientes com hepatite C crônica tratados com DAAs que apresentaram o anticorpo após 12 semanas de tratamento com os novos antivirais (DAAs). Recife,	

	2018.....	51
	..	
Gráfico 3 –	Comportamento dos títulos dos anticorpos anti-anéis e bastões (anti-RR) na amostra antes e após 12 semanas de tratamento nos 14 pacientes com anti-RR positivo após 12 semanas de uso dos novos antivirais (DAAs) .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características clínicas e laboratoriais dos 70 pacientes com hepatite C crônica submetidos a tratamento com os novos antivirais (DAAs). Recife, 2018 .....	44
Tabela 2 –	Características dos tratamentos prévios e atuais dos 70 pacientes com hepatite C crônica submetidos ao tratamento com os novos antivirais (DAAs), Recife, 2018 .....	45
Tabela 3 –	Características clínicas dos 70 pacientes com hepatite C crônica de acordo com a positividade dos anticorpos anti-anéis e bastões antes do tratamento com os novos antivirais (DAAs). Recife, 2018.....	46
Tabela 4 –	Características dos tratamentos prévios dos 70 pacientes com hepatite C crônica de acordo com a positividade dos anticorpos anti-anéis e bastões antes do tratamento com os novos antivirais (DAAs).Recife, 2018 .....	47
Tabela 5 –	Características dos tratamentos prévios e atuais dos 52 pacientes com hepatite C crônica de acordo com a positividade dos anticorpos anti-anéis a bastões após 12 semanas de uso do dos novos antivirais (DAAs). Recife, 2018 .....	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	HEPATITE C.....	14
1.2	OS ANTÍGENOS ANÉIS E BASTÕES.....	15
<b>1.2.1</b>	<b>Morfologia dos anéis e bastões.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Relação com a ribavirina e outras drogas.....</b>	<b>17</b>
1.3	OS ANTI-ANÉIS E BASTÕES.....	17
<b>1.3.1</b>	<b>Relação com PEG e Ribavirina.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Relação com os novos antivirais.....</b>	<b>25</b>
1.4	JUSTIFICATIVA.....	27
1.5	OBJETIVOS.....	27
<b>1.5.1</b>	<b>Objetivos gerais.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
1.6	HIPÓTESE.....	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	28
2.2	LOCAL DO ESTUDO.....	28
2.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Critérios de inclusão.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Critérios de exclusão.....</b>	<b>31</b>
2.4	TIPO DE AMOSTRAGEM.....	31
2.5	DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	31
2.6	OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	31
2.7	DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	34
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
2.9	ASPECTOS ÉTICOS.....	42
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
3.1	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	43
3.2	ANTI-ANÉIS E BASTÕES NA AMOSTRA PRÉ-TRATAMENTO.....	46
<b>3.2.1</b>	<b>Títulos dos anticorpos na amostra pré-tratamento.....</b>	<b>48</b>
3.3	ANTI-ANÉIS E BASTÕES NA AMOSTRA APÓS 12 SEMANAS DE TRATAMENTO ANTIVIRAL.....	49

3.3.1	Títulos dos anticorpos na amostra após 12 semanas de tratamento antiviral.....	51
3.4	RESPOSTA AO TRATAMENTO COM DAAS.....	52
4	DISCUSSÃO.....	53
5	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE A – FICHA PARA COLETA DE DADOS.....	67
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL: LONG-TERM PERSISTENCE OF ANTI-RODS AND RINGS ANTIBODIES IN PATIENTS WITH CHORNIC HEPATITIS C AFTER ANTIVIRAL TREATMENT.....	68
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	82

## 1 INTRODUÇÃO

A motivação para a realização da pesquisa e da dissertação surgiu a partir das grandes mudanças no tratamento da hepatite C com a chegada dos novos antivirais de ação direta (DAAs). Os DAAs permitem a cura da infecção pelo vírus C em menos tempo, com menos efeitos adversos e sem a necessidade do uso do alfa-Interferon peguilado (PEG), que junto com a ribavirina (RBV) constituíram o esquema padrão de tratamento durante muitos anos. O uso da RBV na era dos DAAs está sendo reservado para pacientes com menor chance de resposta (European Association for the Study of the Liver - EASL, 2014).

O vírus da hepatite C (HCV) está associado a efeitos autoimunes, podendo levar ao surgimento de diversos autoanticorpos (BAYRAKTAR et al., 1997). Nos últimos anos, foi descoberto um anticorpo denominado anti-anéis e bastões (anti-*rods and rings* – anti-RR), que surge prioritariamente em pacientes com hepatite C que utilizaram PEG e RBV em seu tratamento. Sabe-se que a RBV é inibidora da enzima ionosina monosfosfato desidrogenase tipo 2 (IMPDH2), principal alvo desse anticorpo. Porém nos diversos estudos realizados, o PEG, que *in vitro* não tem nenhum efeito sobre essa enzima, parece ser um fator necessário para o surgimento do anti-RR (COVINI et al., 2012).

Há controvérsias se a presença dos anti-RR apenas na população tratada com a combinação de PEG e RBV seria pelo pequeno número de pacientes utilizando unicamente a RBV ou aos próprios efeitos imunes induzidos pelo PEG. Além disso, indivíduos com outras comorbidades imunomediadas, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), e em uso de drogas que também inibem a IMPDH2, não apresentaram o anticorpo na mesma proporção que os pacientes com hepatite C, (KEPPEKE et al., 2012) levantando a hipótese de que as alterações imunológicas do próprio vírus poderiam contribuir para a formação dos anticorpos.

Alguns estudos sugeriram uma maior frequência do anti-RR em pacientes que recidivaram ou não responderam ao tratamento, levando à suspeita de sua relação com menor chance de cura (COVINI et al., 2012; NOVEMBRINO et al., 2014). Os novos antivirais de ação direta oferecem taxas de resposta virológica que ultrapassam 90% (SPENGLER, 2017), porém as possibilidades terapêuticas para os que falham a

esses esquemas ainda são escassas. Portanto é preciso tentar minimizar ao máximo a chance dos pacientes terem um desfecho negativo com estas novas drogas.

A relação da RBV com um anticorpo que foi associado à pior resposta clínica em tratamentos prévios foi uma importante motivação para essa pesquisa. Como o uso dessa droga nos esquemas terapêuticos atuais é opcional em alguns casos, maior conhecimento sobre sua relação com os anti-RR poderia sugerir uma vigilância maior quanto à recidiva ou má resposta nos pacientes que necessitassem utilizá-la.

Assim sendo, a pergunta condutora desta pesquisa foi: o emprego dos novos antivirais de ação direta com a RBV seria capaz de induzir o surgimento dos anti-anéis e bastões durante o tratamento de pacientes com hepatite C? A hipótese da autora é que aqueles que serão submetidos ao tratamento da hepatite C com os novos antivirais associados a RBV (mesmo sem uso associado do PEG) apresentarão o anti-RR. Até o momento não há estudos sobre o surgimento desses anticorpos durante ou após o uso dos novos DAAs.

A dissertação está dividida em cinco capítulos. O primeiro trata do referencial teórico, onde se discute sobre os anti-RR, desde as primeiras descrições, a relação com a hepatite C e seu tratamento, até os estudos mais atuais com a relação desse anticorpo e a primeira geração de DAAs. No segundo capítulo há a descrição dos métodos adotados para a realização do estudo. No terceiro e quarto capítulos, há a descrição dos resultados da pesquisa e a discussão desses achados, respectivamente. No quinto capítulo há as conclusões e considerações finais. Como elementos pós-textuais há o Apêndice A com a ficha de coleta dos dados da pesquisa, o Apêndice B com o artigo original fruto da dissertação e o Anexo A com a cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

## 1.1 HEPATITE C

A primeira descrição do HCV foi realizada em 1989 por Choo *et al.* (CHOO *et al.*, 1989), enquanto buscavam o agente etiológico da doença conhecida na época como “hepatite não-A-não-B”. Esse é um vírus da família *Flaviviridae*, cujo genoma consiste em uma fita única de RNA. São conhecidos seis genótipos principais e mais de 120 subtipos já foram caracterizados até o momento (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013).

Estima-se que no mundo existam entre 130 e 150 milhões de pessoas infectadas cronicamente pelo HCV, que causa aproximadamente 700.000 mortes ao ano (World Health Organization - WHO, 2015). Segundo dados do *Global Hepatitis Report* da Organização Mundial de Saúde, as mortes por hepatites virais aumentaram 22% desde os anos 2000 (WHO, 2017). Dados de 2014 estimam que existam 1,4 milhões de infectados no Brasil, com 86% dos casos concentrados nas regiões Sul e Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a), provavelmente por subnotificação na região Nordeste. Em 5 a 20% dos pacientes com HCV, ocorre o desenvolvimento de cirrose hepática em 20 anos, e em 1 a 5% desses pacientes desenvolve-se carcinoma hepatocelular (CDC, 2017).

Além da doença hepática crônica, a infecção pelo HCV tem sido associada a várias alterações imunológicas, incluindo a produção de autoanticorpos. O método padrão para pesquisa de anticorpos é a pesquisa de anticorpo antinuclear (FAN) através de imunofluorescência indireta (IFI) em células Hep-2, as quais são uma linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana que se comprovaram como excelente substrato para autoantígenos pela IFI (DELLAVANCE; ANDRADE, 2006). É descrito resultado positivo de FAN em 7 a 65% dos pacientes com HCV (BAYRAKTAR et al., 1997; CHEN et al., 2009; PENG et al., 2001; WILLIAMS et al., 2009; YEE et al., 2004;), sendo o padrão mais comum o pontilhado nuclear fino (PENG et al., 2001; YEE et al., 2004;).

O HCV exerce seus efeitos autoimunes por diversos mecanismos, incluindo mimetismo molecular e interação entre a região HVR1-E2 do vírus e os receptores CD81 da superfície dos linfócitos B, promovendo sua proliferação e ativação, estimulando a geração desses anticorpos (COCQUEREL et al., 2003). Nos últimos anos, um novo padrão citoplasmático de FAN, conhecido como anti-anéis e bastões (CHAN et al., 2015; DELLAVANCE et al., 2009;), tem se mostrado um caso particular da geração de autoanticorpos relacionado ao HCV.

## 1.2 OS ANTÍGENOS ANÉIS E BASTÕES

A primeira descrição dos anéis e bastões (Rods and rings – RR), antígenos dos anti-RR, ocorreu em 1987 por Willingham *et al.* (WILLINGHAM; RICHERT; RUTHERFORD, 1987). Usando um anticorpo monoclonal, detectaram estruturas

citoplasmáticas fibrilares e as denominaram “nematinas” pela sua aparência vermiforme. Apenas em 2005 houve nova descrição dessas estruturas, por YanShan Ji *et al.* Enquanto pesquisavam o potencial antineoplásico de drogas inibidoras da IMPDH2, descobriram que essas medicações induziam a formação de macroagregados dessa enzima em forma de anéis (JI *et al.*, 2006).

Os RR são compostos por um agrupamento de enzimas intracelulares, primariamente IMPDH2 e a citidina trifosfato sintetase tipo 1 (CTPS1), que se agregam com propósitos funcionais. A IMPDH2 e a CTPS1 são enzimas importantes na via biosintética da Guanosina Trifosfato (GTP) e Citidina Trifosfato (CTP), respectivamente (CARCAMO *et al.*, 2011). A CTPS1 atua catalisando a etapa limitante da geração da CTP a partir da Uridina Trifosfato, estando envolvida na síntese de fosfolipídios e ácidos nucleicos, com grande valor na proliferação celular (CARCAMO *et al.*, 2011; JI *et al.*, 2006). Já a IMPDH2 catalisa a primeira etapa da síntese *de novo* da guanina através da oxidação da ionosina monofosfato em xantina monofosfato. Essa isoforma da IMPDH é encontrada principalmente em células em proliferação normal e com transformação e diferenciação maligna, e por isso tem sido alvo de antivirais, quimioterápicos e imunossupressores (CARCAMO *et al.*, 2011; JI *et al.*, 2006; SEELIG *et al.*, 2011).

Pela função desempenhada por essas proteínas, acredita-se que elas se agreguem formando os RR quando há alguma inibição da via sintética da GTP ou CTP, como uma resposta ao estresse causado pela falta de nutrientes. Provavelmente é uma manobra de controle de sua atividade enzimática, na tentativa de aumentar a produção de GTP/CTP (CALISE *et al.*, 2014; CARCAMO *et al.*, 2014). A função dos RR ainda não é totalmente conhecida porque nenhum estudo avaliou especificamente o estado de atividade enzimática da IMPDH2 ou CTPS1 enquanto agregados como RR (KEPPEKE *et al.*, 2016b).

### **1.2.1 Morfologia dos anéis e bastões**

Morfologicamente, os RR apresentam-se de duas formas principais: discretos bastões filamentosos com 3 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento, e anéis com 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ambos primariamente citoplasmáticos. Geralmente observa-se um a dois bastões e/ou anéis por cada célula. Dependendo da linhagem celular, pode haver diferença no tamanho e na razão entre anéis e bastões (CARCAMO *et al.*, 2011,

2014). Foi demonstrada a presença de RR no núcleo celular, com similaridade estrutural aos citoplasmáticos, porém menores em tamanho (CARCAMO et al., 2014; GOU et al., 2014).

Diversos estudos já investigaram a relação dessa estrutura com outras organelas citoplasmáticas. Não foi encontrada nenhuma relação dos RR com o complexo de Golgi ou cílios primários, e os mesmos surgem independentemente da fase do ciclo celular, sendo vistos em todas as suas etapas. Também foi excluída relação com tubulina, actina e vimentina nos mesmos (CARCAMO et al., 2011; JI et al., 2006; WILLINGHAM; RICHERT; RUTHERFORD, 1987).

### 1.2.2 Relação com a ribavirina e outras drogas

Diversos estudos foram conduzidos para entender melhor os fatores que pudessem causar a indução *in vitro* dos anéis e bastões. Os RRs podem ser induzidos *in vitro* com uso de drogas inibidoras das enzimas envolvidas, sendo a RBV e o ácido micofenólico inibidores da IMPDH2 (sendo a primeira uma inibidora irreversível e o segundo reversível) e o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) e a acivicina da CTPS1 (CARCAMO et al., 2014).

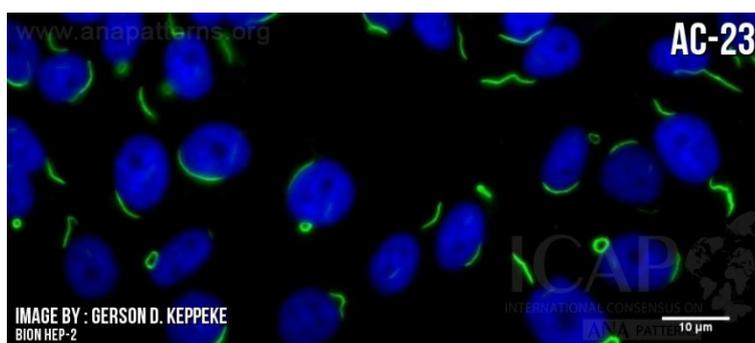
Há ainda estudos que demonstram o surgimento dos RR *in vitro* com adição de metotrexate (MTX), azatioprina (AZA) e aciclovir a culturas celulares. O MTX inibe a dihidrofolato redutase, diminuindo a síntese de folato e afetando a síntese de GTP. O aciclovir é análogo da guanosina, cujos metabólitos também afetam a síntese das purinas. A AZA é convertida em tiinosina monofosfato que inibe a IMPDH. Já o uso de outros antivirais, como tenofovir, adefovir, entecavir e lamivudina, não induz a formação dos RR, mesmo em altas concentrações (KEPPEKE et al., 2016a).

Nos estudos realizados *in vitro*, a RBV mostrou-se o mais potente indutor de RRs, mesmo em concentrações tão baixas quanto 7,81  $\mu\text{M}$  (na qual nem o DON nem a acivicina conseguem induzi-los). A RBV é capaz de induzir o surgimento dos RR em 95% das células cultivadas (KEPPEKE et al., 2016a) em menos tempo (30 minutos *versus* duas a três horas), maior número (mais de dois por célula) (CARCAMO et al., 2011) e que permanecem por mais tempo do que os induzidos por outras drogas (KEPPEKE et al., 2016a).

## 1.3 OS ANTI-ANÉIS E BASTÕES

Em 2011, enquanto realizavam *screening* de anticorpos usando células Hep-2, Seelig *et al.* notaram em cinco pacientes um anticorpo com um realce citoplasmático diferente do habitual, cujo alvo identificado foi a IMPDH2. O padrão de FAN evidenciado era semelhante ao que havia sido mencionado pela primeira vez no 3º consenso de FAN (DELLAVANCE *et al.*, 2009). Ao analisar os dados dos cinco indivíduos que apresentavam esse anticorpo, percebeu-se que quatro deles tinham história de hepatite C, o que levou o grupo a questionar a frequência desse anticorpo nos pacientes com essa infecção (SEELIG *et al.*, 2011). A Figura 1 mostra um exemplo de anti-RR vistos na IFI.

Figura 1 - Anti-anéis e bastões vistos na imunofluorescência indireta



Fonte: Retirado de [www.anapatterns.org](http://www.anapatterns.org)

Utilizando um IMPDH2 radiomarcado, Seelig *et al.* analisaram o soro de 108 pacientes com hepatite C e de outros grupos controle (hepatite B, doadores de sangue saudáveis, entre outros). Por meio de radioimunoprecipitação, detectaram o anti-IMP23 em 38 pacientes (35,2%) com hepatite C. Esse anticorpo foi detectado também em percentual menor nos outros grupos. As maiores concentrações do anticorpo foram encontradas naqueles com HCV e em apenas três pessoas sem essa doença. Todos aqueles com hepatite C que apresentavam o anti-RR haviam sido tratados com PEG e RBV. É importante lembrar que o estudo usou o ELISA, que não avalia necessariamente a presença dos anti-RR, mas sim o anti-IMP23. Os autores sugeriram que essa alta prevalência de anti-IMP23 poderia estar relacionada ao uso da RBV, que é inibidora dessa enzima *in vitro* (SEELIG *et al.*, 2011).

Seelig *et al.* não conseguiram demonstrar esse anticorpo em todos os kits de Hep-2 utilizados para IFI. Isso porque os anti-RR não são identificados em todas as

preparações comerciais de células Hep-2, tendo sido identificados apenas nas preparações da INOVA *Diagnostics* Inc. (San Diego, CA, EUA), Euroimmun (Lubeck, Alemanha) e Medical & Biological Laboratories Co. (Nagoya, Japão) (CALISE et al., 2018; CARCAMO et al., 2011; CHOI et al., 2015; SEELIG et al., 2011). Os testes com outros fabricantes (*Orgentec, Menarini, Generic Assays, AESKU, AID, Hemagen, MBL Bion e Imuno Concepts*) não são capazes de detectar esse anticorpo, apresentando geralmente padrão pontilhado citoplasmático inespecífico (KEPPEKE et al., 2012; SEELIG et al., 2011).

Em 2012, Covini *et al.* pesquisaram os anti-RR no soro de 75 pacientes com hepatite C, antes e após o uso de Interferon Peguilado alfa-2a e RBV. O tratamento durava de 24 (genótipos 2 e 3) a 48 semanas (genótipos 1 e 4). Os participantes do estudo eram considerados não respondedores (NR) se o HCV RNA fosse detectável na 24<sup>a</sup> semana de uso das medicações, recidivantes (REC) se houvesse ressurgimento do HCV RNA após o fim do tratamento naqueles que haviam respondido antes, e respondedores se HCV RNA negativo 24 semanas após o fim do tratamento. Como controles, usaram o soro de pacientes com outras doenças hepáticas e doadores de sangue saudáveis (COVINI et al., 2012).

Covini *et al.* detectaram os anti-RR em 15 pacientes (20%) com HCV que haviam recebido PEG e RBV. O anticorpo não foi detectado em nenhum deles antes de terem recebido essas medicações e em nenhum dos que pertenciam aos grupos controle. A presença dos anti-RR foi mais frequente nos NR/ REC (10/30, 33%) do que nos que responderam ao tratamento (5/45, 11%) ( $p = 0,037$ ). Em outras palavras, a prevalência de não respondedores e recidivantes foi maior naqueles com anticorpo positivo (10/15, 67%) do que nos negativos (20/60, 37%),  $p = 0,0037$ . O grupo testou o uso do PEG *in vitro* em culturas celulares, porém, não observou a indução dos RR com o uso isolado desse medicamento, apenas com o uso isolado da RBV (COVINI et al., 2012).

Carcamo *et al.* analisaram o soro de duas coortes de pacientes com anti-RR positivo, sendo 47 americanos e 46 italianos, todos previamente tratados com PEG e RBV nas doses e esquemas recomendados. Os americanos tinham títulos dos anti-RR de 1:50 a > 1: 819.200, com média de 1:1.200. Já os italianos apresentavam títulos de 1:200 a > 1:819.200, com média de 1:25.600 ( $p = 0,0003$ ). Utilizando imunoprecipitação para avaliar a presença do anti-IMP2, foi detectado que 96% dos pacientes da coorte italiana e 53% da americana apresentavam esse anticorpo,

com uma maior intensidade na banda de precipitação na coorte italiana. Além disso, os indivíduos de ambas as coortes com os maiores títulos também apresentavam maior intensidade na imunoprecipitação, sugerindo novamente uma validação do achado de que a IMPDH2 é o alvo principal dos anti-RR, mas não o único (CARCAMO et al., 2013). Ao testar o soro de pacientes brasileiros usando a mesma metodologia, Keppeke descreveu que 80% (12 de 15) reconheceram o IMPDH2 (KEPPEKE et al., 2014).

Nesse estudo de Carcamo *et al.* de 2013, também foi pesquisada associação entre os títulos dos anti-RR, intensidade de imunoprecipitação e resposta ao tratamento. Na coorte americana os NR/ REC apresentavam os maiores títulos (média de 1:3.200 vs 1:100;  $p= 0,0016$ ) e maior intensidade na banda de precipitação, enquanto que na coorte italiana os REC apresentavam títulos maiores e maior intensidade que NR e respondedores ( $p= 0,0040$  e  $p= 0,015$  respectivamente). Não se sabe porque a coorte americana apresentou percentual de imunoprecipitação do anti-IMPDH2 tão menor que a italiana, acredita-se que por algum componente não identificado nos anti-RR, ou diferenças ambientais e genéticas (CARCAMO et al., 2013).

Um estudo da Universidade de Teerã também sugeriu a importância de possíveis fatores genéticos e ambientais no surgimento dos anti-RR. Foram analisados soros de 120 pacientes com história de hepatite C divididos em três grupos: *clearance* viral espontâneo ( $n=40$ ), resposta virológica sustentada após PEG e RBV ( $n=40$ ) e recidiva após PEG e RBV ( $n=40$ ). Apenas um paciente (0,8%), do grupo dos recidivantes, apresentou o anticorpo, um percentual inferior aos demais estudos, fortalecendo a hipótese de que o surgimento dos anti-RR varia em diferentes populações (AFSHARZADEH et al., 2016).

Em 2012, Keppeke *et al.* pesquisaram os anti-RR no soro de 597 pacientes, sendo 342 brasileiros com hepatite C (176 tratados), 55 coinfectados HCV-HIV, 51 portadores de LES usando ácido micofenólico e outros grupos controle com doenças hepáticas e autoimunes. O anti-RR foi detectado no soro de 9,5% dos avaliados no total (57/597), 14,1% dos pacientes com HCV (56/397) e 3,4% daqueles com hepatite B (1/29), estando novamente esse anticorpo fortemente associado ao HCV ( $p< 0,0001$ ). Não houve diferença significativa na reatividade do anticorpo entre os mono infectados e coinfectados com HIV ( $p=0,301$ ). Esse anticorpo mostrou-se

associado ao tratamento prévio da hepatite C, com surgimento em 29% dos tratados (51/176) e nenhum dos não tratados ( $p < 0,0001$ ) (KEPPEKE et al., 2012).

Só haviam informações precisas sobre o tratamento usado em 134 dos 397 pacientes com hepatite C: 108 receberam PEG e RBV, 23 receberam apenas PEG e três receberam apenas RBV. O anti-RR foi encontrado em 38% dos que receberam a terapia dupla (41/108) e em nenhum dos que recebeu alguma das medicações isoladas ( $p = 0,0001$ ). Outros padrões de FAN foram mais frequentes naqueles recebendo apenas PEG (52,2%) do que nos que receberam a terapia dupla (25%) ou apenas RBV (33%) ( $p = 0,01$ ). Entre os coinfectados, o anti-RR só foi detectado nos que fizeram a terapia dupla (KEPPEKE et al., 2012).

Nas análises seriadas dos que receberam PEG e RBV nesse estudo de Keppeke, nenhum era positivo para o anti-RR antes do uso das medicações e todos foram positivando ao longo dos meses de tratamento (em 47% o anticorpo surgiu no sexto mês). O anticorpo permaneceu positivo por até um ano após o fim da terapia antiviral em metade dos pacientes. Os outros padrões de FAN não demonstraram relação com o tempo de uso de PEG e RBV. Esse estudo não encontrou relação entre a presença do anti-RR ou seus títulos com a resposta terapêutica (KEPPEKE et al., 2012). Outros estudos que avaliaram a cinética do anti-RR também encontraram que a maioria dos pacientes começa a apresentar o anticorpo no sexto mês de tratamento, com maiores títulos no décimo segundo mês (CLIMENT et al, 2016; KEPPEKE et al., 2014)

Stinton *et al.* avaliaram o soro de 315 pacientes, sendo 301 com HCV virgens de terapia antiviral e 14 com hepatite C curados após tratamento (três apenas com PEG e 11 com PEG e RBV). O anti-RR foi detectado em 4,8% da população do estudo. Os que apresentaram o anticorpo tinham uma chance maior de ter recebido esquema terapêutico prévio contra o HCV (33% vs. 3% OR 16,2 [IC 95% 4,6-57,1];  $p < 0,0005$ ). Enquanto cinco dos 11 pacientes que receberam PEG e RBV eram positivos, nenhum dos que recebeu apenas PEG apresentou o anticorpo ( $p = 0,26$ ). Na análise de regressão multivariada, o tratamento prévio com PEG e RBV foi o único preditor de positividade do anti-RR (OR 20,5 [IC95% 5,1-83,2]  $p < 0,0005$ ) (STINTON et al., 2013).

Em 2014, Novembrino *et al.* avaliaram o soro de 88 pacientes com hepatite C para pesquisar a incidência do anti-RR durante o uso de PEG e RBV. Antes de receber as medicações, todos eram negativos, tendo 32 pacientes (36%) positivado ao longo do tratamento. Foi encontrada maior ocorrência e maiores títulos naqueles com

genótipos 1 e 4, porém esses genótipos eram os que recebiam o esquema terapêutico mais prolongado, podendo esse ter sido um fator de confusão. O anti-RR também foi encontrado mais frequentemente em REC do que nos respondedores e NR ( $p=0,0282$ ), porém análise de regressão multivariada não encontrou que a presença do anticorpo foi um preditor significativamente associado à resposta clínica (NOVEMBRINO et al., 2014). O estudo encontrou as maiores taxas de positividade do anti-RR nos pacientes que fizeram uso mais prolongado de PEG e RBV (48 semanas), observando-se taxas de 9%, 38% e 53% nas semanas 12, 24 e 48, respectivamente.

Alguns estudos demonstraram a presença do anti-RR em pacientes sem HCV nem história de uso de PEG ou RBV. Em 2013, Shaikh *et al.* publicaram estudo que usou dados da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES). Foram avaliadas amostras de soro de 4738 indivíduos e 39 deles (0,74%) apresentaram positividade do anti-RR. Desses, apenas um tinha hepatite C e havia feito uso de alfa-interferon. Infelizmente não havia informações mais detalhadas sobre o histórico médico dos participantes do estudo (SHAIKH et al, 2013).

Além de serem encontrados na população geral, os anti-RR também podem estar presentes em pacientes usando drogas indutoras dos RR *in vitro*. Porém como essas drogas possuem capacidade de indução dos RR menor que a da RBV, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o percentual de pacientes com o anticorpo é menor. Estudo com 163 pacientes com LES (78 usando ácido micofenólico, 55 usando AZA e 30 usando MTX) e 10 com outras comorbidades usando MTX, evidenciou os anti-RR em apenas um deles (KEPPEKE et al., 2016a).

Novembrino *et al.* encontraram a presença dos anti-RR em transplantados hepáticos que usavam ácido micofenólico, sendo que 80% dos participantes desse estudo possuíam hepatite C e haviam feito PEG e RBV previamente. Ao avaliar uma população de transplantados renais que também usavam o ácido micofenólico, o anti-RR não foi detectado (NOVEMBRINO, 2013).

Keppeke *et al.* pesquisaram dados clínicos de um grupo de pacientes com anti-RR identificados numa rede de laboratórios entre 2013 e 2015. Dos 48 positivos, 45 tinham hepatite C com uso prévio de PEG e RBV. Dos outros três, um tinha recebido aciclovir recentemente, e os outros dois não tinham uso atual ou prévio de drogas que pudessem induzir o anticorpo (KEPPEKE et al., 2016a).

Um estudo espanhol avaliou amostras de soro de 22915 indivíduos, encontrando os anti-RR em 87 deles. Destes, 73 (84%) eram pacientes com hepatite

C. Os 14 restantes possuíam as mais diversas comorbidades não relacionadas ao HCV (asma, psoríase, LES), sendo oito deles portadores de doenças autoimunes, um deles utilizando ácido micofenólico e três usando MTX. Dentre os 73 pacientes com anti-RR e HCV positivos, havia informações sobre uso de terapia antiviral prévia em 68: 19 estavam recebendo tratamento, 32 já haviam recebido e em 17 não havia histórico de uso de PEG e RBV (CLIMENT et al, 2016).

Probst *et al.* identificaram anti-IMPDPH2 por meio de RC-IFA em 21 de 50 pacientes com HCV (42%). Destes, 17 tinham tratamento prévio com PEG e RBV. Sete deles com o anti-RR confirmado também por IFI. Além disso, 5 de 100 pacientes com hepatite autoimune e 3 de 50 indivíduos saudáveis apresentaram o anti-IMPDPH2 por essa técnica, porém nenhum apresentou o anti-RR. Acredita-se que talvez outras doenças ou drogas possam causar inibição da síntese do GTP/CTP causando o surgimento do anti-IMPDPH2 (PROBST et al., 2013).

Estudos com soro de pacientes com o anti-RR na IFI demonstraram que alguns deles não apresentam imunoprecipitação do IMPDPH2 nem do CTPS1. Esse achado, somado à desproporção entre o tamanho dos RR e o dessas enzimas, sugere que haja outros componentes envolvidos (COVINI et al., 2012). Vários estudos confirmaram o IMPDPH2 como um antígeno primário dos anti-RR, pesquisando-o nos que apresentavam esse anticorpo pelos mais diversos métodos. Porém em nenhum desses estudos 100% dos anti-RR apresentavam reação com a IMPDPH2, sugerindo a possibilidade de outros antígenos (CARCAMO et al., 2013; KEPPEKE et al., 2014).

O Quadro 1 resume os principais estudos publicados no MEDLINE entre 2012 e 2017 envolvendo os anti-anéis e bastões.

Quadro 1 – Principais estudos descrevendo a ocorrência do anti-RR publicados no MEDLINE entre 2012 e 2017

Publicação	N	Resultados	Observação
<b>Covini 2012</b>	579 pacientes (75 com HCV)	Anti-RR em 20% dos HCV. Prevalência maior nos REC/NR do que nos RVS (33 vs. 11%, $p= 0,037$ )	Anti-RR só nos HCV+. Maior prevalência nos recidivantes.
<b>Keppeke 2012</b>	597 (176 tratados)	HCV Anti-RR em 14,1% dos HCV, 3,1% dos VHB	Sem associação com resposta ao tratamento

<b>Carcamo 2013</b>	93 HCV anti-RR+	Na coorte americana maiores títulos nos NR/REC vs RVS ( $p=0,0016$ ), na italiana maiores títulos no REC vs. RVS ( $p= 0,004$ e $p= 0,015$ ).	Maiores títulos nos REC
<b>Shaik 2013</b>	4738 pessoas	Anti-RR em 0,74% dos pacientes. Apenas 1 deles com hepatite C	Presença do anti-RR não exclusiva dos HCV
<b>Stinton 2013</b>	315 HCV (301 virgens de tto)	Prevalência de 4,8% de anti-RR	Maior prevalência do anti-RR nos que receberam tto (33% vs 3% $p < 0,0005$ )
<b>Novembrino 2014</b>	88 HCV pré-tratamento	Anti-RR em 36% dos HCV após início do tratamento.	Maior prevalência nos REC do que NR e SVR ( $p= 0,0282$ )
<b>Climent 2016</b>	Amostras de soro de 22915 pessoas	Anti-RR em 87 deles (0,37%).	Dos 87, 73 pacientes com hepatite C, 17 sem história de uso de PEG e RBV

Siglas: HCV (vírus da hepatite C), anti-RR (anti-anéis e bastões), REC (recidivantes), NR (não respondedor), RVS (resposta virológica sustentada), VHB (vírus da hepatite B), TTO (tratamento).

Fonte: a autora.

### 1.3.1 Relação com PEG e Ribavirina

Até recentemente, o esquema terapêutico padrão para a hepatite C era o PEG 2a ou 2b (180mcg por semana ou 1,5 mcg/kg, respectivamente), associado a RBV (15mg/Kg) por 24 a 48 semanas, a depender do genótipo do HCV. Infelizmente esse tratamento só era eficaz em 40 a 80% dos pacientes (EASL, 2014). O PEG age induzindo os genes regulados por Interferon, que fornecem uma resposta antiviral inespecífica porém bastante potente. Já a RBV é um análogo sintético da guanossina, que age inibindo a RNA polimerase do vírus. No meio intracelular, a RBV é metabolizada na forma monofosfato, que é o inibidor competitivo da IMPDH2, causando depleção de GTP necessário para a síntese de RNA pelo vírus. Isoladamente, a RBV é capaz de reduzir transaminases porém não tem efeito significativo sobre o HCV, sendo usada em associação com o PEG (STRADER;

SEEFF, 2012). Pelo seu efeito em reduzir as transaminases, essa droga já foi utilizada isoladamente de forma *off-label* em alguns casos. Por conta desse pequeno número de pacientes, não há estudos que confirmem que seu uso *in vivo* sem associação do PEG seja capaz de causar o anti-RR (KEPPEKE et al., 2016b).

O uso de PEG pode acelerar o curso de doenças autoimunes pré-existentes ou favorecer recaída dessas doenças ou surgimento de anticorpos (LOPES et al, 1995). Especula-se que os pacientes desenvolvam anti-RR pela exposição a RR induzida por RBV durante o uso de PEG e RBV, provavelmente com alguma participação da ativação das células B provocada pelo HCV (CARCAMO et al., 2013). Ainda não se sabe se alguma das proteínas do HCV está associada ao surgimento dos anti-RR, como acontece com diversos outros anticorpos já mencionados, ou se formam-se agregados de proteínas virais e do paciente durante alguma das fases da patogênese do vírus. Apesar da influência no surgimento de anticorpos, Keppeke *et al.* não demonstraram diferença nos demais padrões de FAN antes e após o tratamento com PEG e RBV como foi demonstrado com o anti-RR (KEPPEKE et al., 2012).

### **1.3.2 Relação com os novos antivirais**

Até o ano de 2011, PEG e RBV eram as únicas drogas disponíveis para tratamento do HCV. Em 2011 foram aprovados o boceprevir (BOC) e o telaprevir (TELA) (BACON et al., 2011; JACOBSON et al., 2011), considerados a primeira geração dos antivirais de ação direta, que eram utilizados em conjunto com PEG e RBV para pacientes com HCV genótipo 1. Os mesmos não tinham taxas de cura tão superiores e apresentavam muitos efeitos colaterais, não sendo mais utilizados atualmente.

Nos últimos anos, diversos novos DAAs foram desenvolvidos, permitindo que o tratamento seja realizado sem a necessidade do PEG e com uso da RBV em pacientes com piores chances de resposta virológica sustentada (cirróticos, previamente tratados). As taxas de cura com os novos DAAs ultrapassam 90%, com poucos efeitos colaterais relatados até o momento (EASL, 2014).

No Brasil, o uso dessas medicações é liberado pelo Ministério da Saúde desde 2015 para aqueles que preenchem os critérios mencionados no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hepatite C e coinfeccções (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015b). Os medicamentos liberados atualmente são Sofosbuvir 400mg, Simeprevir

150mg, Daclatasvir 30 ou 60mg, esquema 3D (Veruprevir 75mg / ritonavir 50mg / ombitasvir 12,5mg + dasabuvir 250mg), Sofosbuvir 400mg/Ledispavir 90mg, Elbasvir 50mg/ Grazoprevir 100mg, utilizados com ou sem RBV, a depender do genótipo, grau de fibrose e outras características clínicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Apesar do seu uso na Europa e Estados Unidos já estar disseminado desde 2014, ainda não há publicações sobre a presença de anti-RR nos pacientes tratados com esses antivirais e sem uso do PEG.

Entre 2013 e 2014, Calise *et al.* pesquisaram a presença do anti-RR em 52 pacientes com hepatite C que realizariam tratamento com PEG, RBV e TELA. Encontraram a positividade do anti-RR em 10 deles (19%). Em dois, o anticorpo estava presente antes do início das medicações, pelo uso prévio de PEG e RBV há mais de 10 anos. A positividade desse anticorpo foi associada a maior frequência de recidivantes, porém não de não respondedores. Concluiu-se que a adição do TELA não pareceu aumentar o surgimento do anticorpo nem alterou os títulos do anti-RR nos que eram previamente positivos (CALISE *et al.*, 2016b).

Um estudo de Dammermann *et al.* pesquisou o anti-IMP2 e o anti-RR em 163 pacientes. Cinquenta e nove deles faziam parte de uma coorte histórica que recebeu PEG e RBV, 37 deles receberam PEG, RBV e BOC e 67 deles receberam PEG, RBV e TELA. Ao todo 39% apresentaram positividade para o anti-IMP2 e 26% apresentaram o anti-RR. Apenas um paciente com anti-RR positivo não apresentou o anti-IMP2, com a positividade dos dois anticorpos significativamente dependente uma da outra ( $p < 0,001$ ). Com relação ao uso de BOC e TELA, não houve diferenças importantes entre o surgimento e padrão dos anticorpos, sugerindo que essas drogas não teriam influência. Além disso, a RVS após o tratamento não foi relacionada ao anti-RR ( $p=1$ ) ou anti-IMP2 ( $p=0,42$ ) (DAMMERMANN *et al.*, 2017).

## 1.4 JUSTIFICATIVA

O presente estudo teve como justificativa a melhor compreensão da ocorrência do anti-RR, que pode ter alguma relação com a resposta ao tratamento do HCV. Esse vírus gera altos custos na saúde pública pois possui elevada morbimortalidade. Com os novos esquemas terapêuticos, será possível avaliar um número maior de pacientes utilizando a RBV sem associação do PEG e finalmente elucidar se ela é realmente a principal responsável pelo surgimento do anticorpo. Além disso, verificar se o surgimento do anti-RR ocorre com o uso desses novos antivirais e se interfere de alguma forma na resposta terapêutica dessas drogas.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Descrever a ocorrência do anticorpo anti-anéis e bastões em pacientes com hepatite crônica pelo HCV antes e após o tratamento com os novos antivirais de ação direta.

### 1.5.2 Objetivos Específicos

1. Descrever e comparar as características biológicas dos pacientes que apresentarem o anti-RR tanto antes quanto após 12 semanas de tratamento com os novos antivirais.
2. Descrever a associação da prevalência do anti-RR na amostra pré-tratamento com a realização de terapia prévia contra a hepatite C.
3. Verificar nos pacientes previamente tratados a associação entre a presença do anti-RR e a duração e esquema do tratamento anterior.
4. Relatar o surgimento dos anti-RR durante o tratamento da hepatite C com os novos antivirais, com e sem Ribavirina.

## 1.6 HIPÓTESE

Pacientes que serão submetidos ao tratamento da hepatite C crônica com os novos antivirais e RBV, poderão desenvolver o anticorpo anti-anéis e bastões mesmo sem uso associado do PEG.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, seguido de estudo longitudinal de acompanhamento de um grupo de pacientes submetidos ao tratamento com os novos antivirais. Os participantes incluídos foram seguidos do início do seu tratamento até 12 semanas após o fim do mesmo. O tempo total de acompanhamento variou de 24 a 36 semanas a depender da terapêutica estipulada previamente pelos médicos do serviço, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e coinfeções (PCDT) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015b). O fluxograma de operacionalização do estudo encontra-se exposto na Figura 2.

### 2.2 LOCAL DO ESTUDO

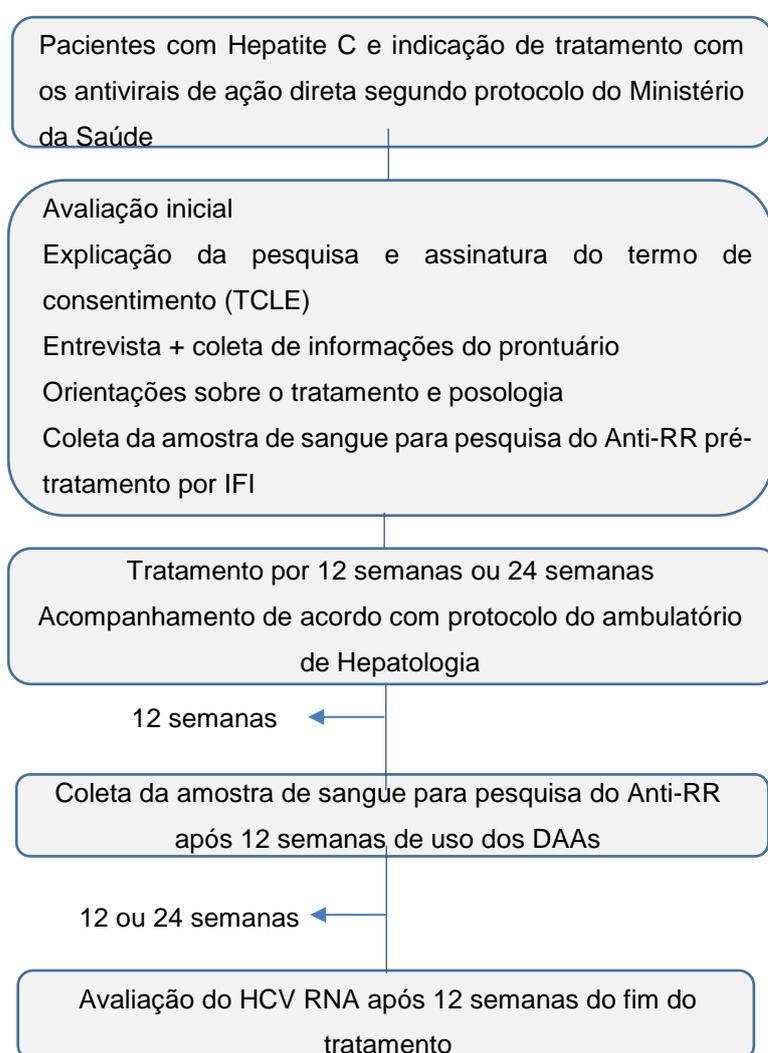
No Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde os pacientes eram atendidos, ocorreu a entrevista e coleta de soro dos mesmos. A entrevista foi realizada pela pesquisadora e a coleta de soro por flebotomista. O ambulatório dispõe de sala adequada e material necessário para realização da consulta. Os exames de imunofluorescência indireta para pesquisa do anti-RR foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da UFPE.

### 2.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população estudada foi constituída por indivíduos acima de 18 anos com hepatite C crônica, comprovada por meio de anti-HCV reagente há mais de seis meses da avaliação inicial, com confirmação diagnóstica por meio de HCV RNA detectado pelo Kit Real Time PCR da Abbot<sup>®</sup> por método de reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) em tempo real. Esses pacientes eram assistidos no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE pelos preceptores e residentes do serviço. Os que preencheram os critérios para realização do tratamento com os novos antivirais propostos no PCDT

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015b), foram encaminhados à Farmácia de Pernambuco para cadastro e recebimento da medicação. Os mesmos eram orientados a retornar ao ambulatório com a medicação para início do tratamento após instrução da posologia e avaliação de possíveis interações medicamentosas com suas medicações de uso contínuo.

Figura 2- Fluxograma para operacionalização do estudo dos anticorpos anti-anéis e bastões em pacientes com Hepatite C em uso dos novos DAAs com e sem ribavirina



IFI: Imunofluorescência Indireta; HCV RNA: teste de detecção dos ácidos nucleicos do vírus C.

O tratamento realizado pelos pacientes foi indicado a depender do genótipo do HCV e de comorbidades (coinfeccção com HIV, escore de Child-Pugh), baseado no PCDT para Hepatite C e Coinfeccções (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015b). O emprego

da ribavirina associada aos DAAs foi realizado especialmente em cirróticos, naqueles com resposta nula à terapia prévia ou de forma opcional em coinfectados HIV-HCV, independentemente do estágio de fibrose. O Quadro 2 mostra os esquemas terapêuticos utilizados pelos pacientes.

Quadro 2 – Esquemas terapêuticos utilizados pela população do estudo dos anticorpos anti-aneis e bastões em pacientes com hepatite C em uso dos novos DAAs

Genótipo	Tratamento	Duração
<b>1 (Mono infectado)</b>	Sofosbuvir 400mg e Simeprevir 150mg (± Ribavirina 11mg/Kg/d) <b>OU</b> Sofosbuvir 400mg e Daclatasvir 60mg (± Ribavirina 11mg/Kg/d)	12 semanas
<b>1 – Coinfectado HIV E/OU uso prévio de Boceprevir/Telaprevir E/OU Cirrose Child-Pugh B e C</b>	Sofosbuvir 400mg e Daclatasvir 60mg <sup>‡</sup> (± Ribavirina 11mg/Kg/d)	12 a 24 semanas
<b>2</b>	Sofosbuvir 400mg e Ribavirina 11mg/Kg/d	12 semanas
<b>3</b>	Sofosbuvir 400mg, Daclatasvir 60mg e Ribavirina 11mg/Kg	12 a 24 semanas*
<b>4</b>	Sofosbuvir 400mg e Daclatasvir 60mg	12 semanas

<sup>‡</sup>Pacientes coinfectados HIV/HCV em uso de terapia antirretroviral (TARV) que contivesse efavirenz, etravirina, nevirapina ou atazanavir/ritonavir recebiam apresentação de 30mg do Daclatasvir

\* Durante o período do estudo, o tempo de tratamento liberado para pacientes cirróticos com Genótipo 3 foi modificado de 12 para 24 semanas visando melhor resposta ao tratamento. Fonte: a autora

A pesquisadora recebeu os pacientes, e após avaliação clínica e orientações sobre as medicações, convidava-os a participarem da pesquisa. Após assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido e explicação do estudo, os participantes eram submetidos à coleta de soro. Foram incluídos todos que aceitaram participar do estudo.

### **2.3.1 Critérios de inclusão**

Pacientes acima de 18 anos de ambos os sexos, com hepatite C crônica, submetidos ao tratamento com os novos antivirais de ação direta que concordaram em participar do estudo.

### **2.3.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes que iriam fazer uso de alfa-interferon
- Pacientes que não realizaram a coleta de sangue inicial

## **2.4 TIPO DE AMOSTRAGEM**

Amostragem por conveniência. Todos os pacientes do ambulatório com indicação de tratamento antiviral foram avaliados consecutivamente.

## **2.5 DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA**

Todos os pacientes selecionados para tratamento foram convidados a participar do estudo, portanto não foi calculado o tamanho da amostra. O período de inclusão durou 16 meses, na tentativa de conseguir o maior número possível de participantes.

## **2.6 OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO**

Os dados dos pacientes foram coletados pela própria pesquisadora através de entrevista e revisão em prontuário e registrados em ficha de coleta específica, conforme o apêndice A. A coleta de dados acontecia na consulta inicial e os resultados de HCV RNA eram avaliados em consulta subsequente ou através de pesquisa em prontuário. As coletas de soro ocorriam na consulta inicial e após 12 semanas de uso das medicações, independente se o esquema terapêutico iria durar 12 ou 24 semanas. Visto que o número de pacientes usando os DAAs por 24 semanas era restrito, preferiu-se uniformizar o tempo de exposição às medicações com a coleta em 12 semanas.

O soro coletado foi centrifugado e armazenado em freezer a temperatura de -20°C até o momento da realização dos exames. Os exames de IFI foram realizados por profissional experiente do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da UFPE, seguindo metodologia orientada pelo fabricante EUROIMMUN® (Lubeck, Alemanha), usando o Kit Hep-2 FA 1520 do fabricante citado.

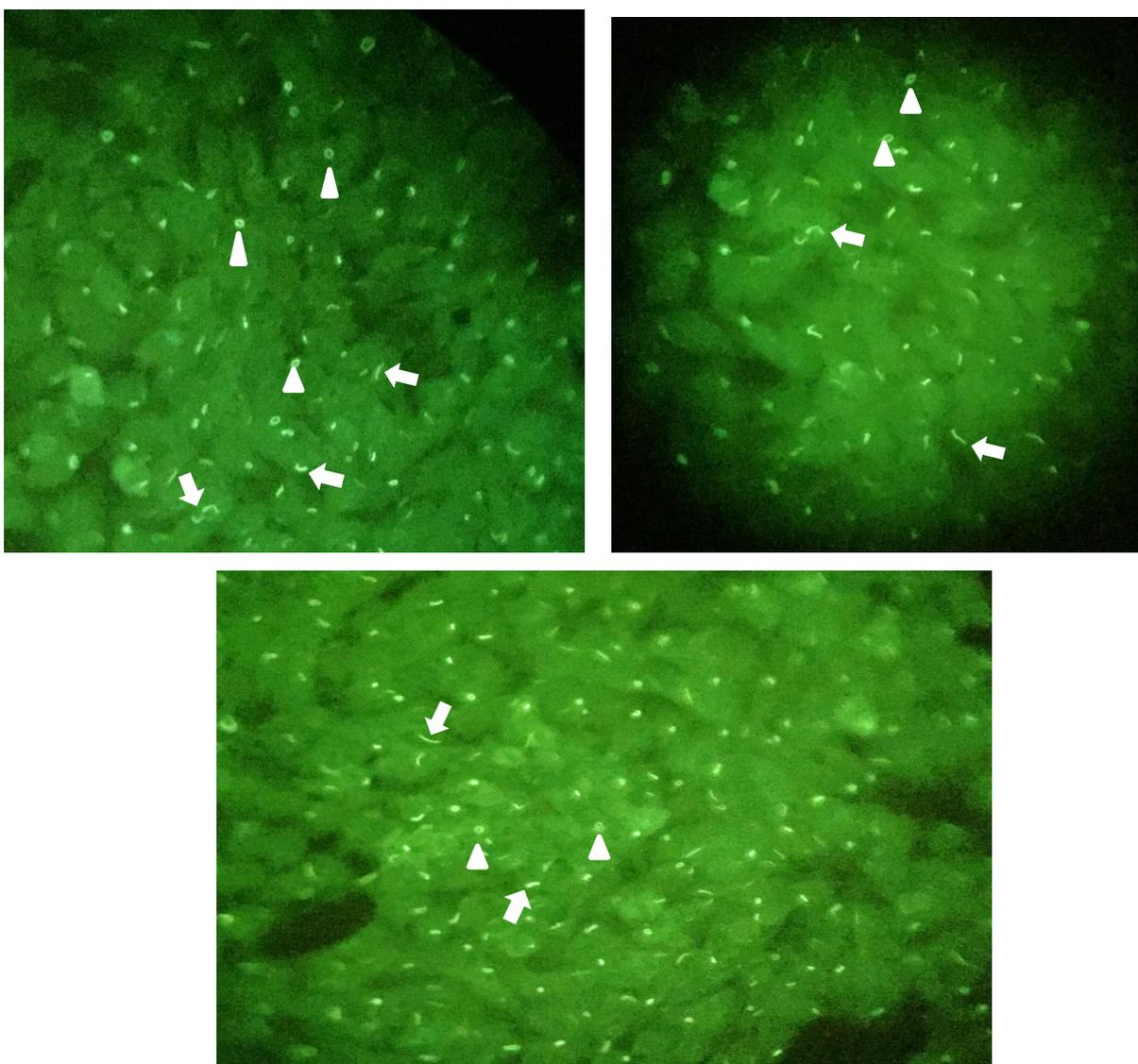
As células HEp-2 foram incubadas com a amostra do paciente diluída em tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* – PBS). Foram aplicados 30 µL de amostra diluída em cada campo da bandeja de reação, com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a lavagem das lâminas, com PBS. Na etapa de pipetagem aplicou-se 25 µL da anti-igG humana marcada com fluoresceína (conjugado), com incubação por 30 minutos em local protegido da luz. Posteriormente ocorreu nova lavagem com PBS e a montagem com no máximo 10 µL meio de montagem (glycerol) por campo.

As lâminas eram de 10 poços, sendo em todas as lâminas realizado um controle negativo e um positivo. Os soros com resultado positivo foram separados para serem titulados até negatificação da fluorescência, seguindo o mesmo processo, modificando apenas a diluição inicial. As análises foram realizadas em Microscópio de Imunofluorescência Olympus BX 41 com objetiva de 40. Todos os pacientes considerados como portadores do anti-RR apresentaram o padrão de FAN *rods and rings*, designado como padrão AC-23 pelo Consenso Internacional de Padrões de FAN (CHAN et al., 2015) em título igual ou maior que 1/40. O IV Consenso Brasileiro de FAN (FRANDESCANTONIO, et al., 2014) orienta que esse exame seja realizado com uma diluição inicial de 1/80 para evitar que a presença de baixos títulos leve a errôneos diagnósticos de doenças autoimunes. Porém como nosso objetivo era apenas a detecção do anticorpo, optamos por iniciar a diluição em 1/40, como

realizado em outros estudos de anti- anéis e bastões (COVINI et al., 2012; CARCAMO et al., 2013; CLIMENT et al., 2015). A profissional que realizou e avaliou os exames desconhecia os dados clínicos e o tratamento realizado pelos pacientes. A Figura 3 exemplifica resultados positivos do anti-RR encontrados neste estudo.

Os dados coletados foram tabulados em dupla entrada em software Microsoft Excel para Windows® (versão 2013) para posterior análise estatística.

Figura 3 – Exames de imunofluorescência indireta evidenciando os anticorpos anti-anéis e bastões em pacientes do presente estudo



As setas brancas evidenciam os bastões e os triângulos brancos os anéis do anti-RR.  
Fonte: a autora.

## 2.7 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

As variáveis utilizadas estão discriminadas no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3: Definição das variáveis adotadas no estudo dos anticorpos anti-anéis e bastões em pacientes com hepatite C crônica em uso novos DAAs

<b>Variável dependente</b>	<b>Definição teórica</b>	<b>Definição operacional</b>	<b>Categorização</b>
Anti- anéis e bastões	Padrão citoplasmático de FAN que se apresenta com discretos anéis com 2-5µm de diâmetro e bastões com 3-10 µm, cujo principal alvo é a IMPDH2	Resultado positivo em exame de IFI realizado no laboratório do HC UFPE utilizando o kit Hep-2 da Euroimmun®	Negativo Positivo 1:40 Positivo 1:80 Positivo 1:160 Positivo 1:320 Positivo 1:640 Positivo 1:1260
<b>Variável independente</b>	<b>Definição teórica</b>	<b>Definição operacional</b>	<b>Categorização</b>
Idade	Variável contínua definida pelo tempo de vida decorrido desde a data de nascimento até a data do início do tratamento	Calculada em anos completos pela data de nascimento que consta do registro geral fornecido pelo paciente e registrado na data de realização da entrevista	Variável quantitativa contínua.
Sexo	Variável qualitativa. Distinção de	Informação coletada em entrevista.	Variável qualitativa dicotômica:

	indivíduos a partir de caracteres biológicos sexuais		-Masculino -Feminino
Cirrose Hepática	Presença de achados ultrassonográficos compatíveis com doença hepática crônica e/ou presença de varizes esofágicas em endoscopia	Pesquisa no prontuário	Variável qualitativa dicotômica: -SIM - NÃO
Coinfectado HIV/HCV	Variável categórica. Portador de teste rápido ou ELISA para HIV positivos e anti-HCV positivo por mais de seis meses e HCV RNA detectável	Entrevista e pesquisa de prontuário	Variável qualitativa dicotômica: -SIM -NÃO
Esquistossomos e Hepatoesplênica	Variável categórica. Presença de doença hepática pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	Presença de fibrose periportal na ultrassonografia ou relato em prontuário de diagnóstico de esquistossomose	Variável dicotômica: -SIM -NÃO

Diabetes Mellitus tipo 2	Alteração metabólica relacionada ao aumento da glicemia resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção da insulina ou em ambas	Entrevista e avaliação em prontuário. Considerados diabéticos conforme critério diagnóstico da Sociedade Brasileira de Diabetes	Variável categórica dicotômica: -SIM -NÃO
Uso de Drogas associadas aos anti-anéis e bastões	Variável categórica. Algumas drogas foram relacionadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> à presença dos anti-anéis e bastões: Azatioprina, Micofenolato de Mofetila, Metotrexato, Aciclovir	Entrevista e pesquisa em prontuário	Variável categórica dicotômica: -SIM -NÃO
Fibrose significativa nos últimos dois anos	Variável categórica ordinal. Fibrose hepática é o resultado de uma resposta cicatricial do fígado à agressão	Resultado de biópsia hepática, ou elastografia hepática por Fibroscan® ou ARFI utilizando os valores de ponto de corte	F2 F3 F4

	causada pelos vírus ou outras causas de doença hepática crônica. Essa avaliação pode ser feita através da biópsia hepática (padrão-ouro) utilizando o escore de Metavir. Formas não invasivas de avaliação incluem a elastografia por Fibroscan® e ARFI.	estipulados para cada estágio de fibrose, com valores iguais ou superiores à F2 de Metavir.	
Fibrose avançada nos últimos dois anos	Variável categórica ordinal. A fibrose hepática é o resultado de uma resposta cicatricial do fígado à agressão causada pelos vírus ou outras causas de doença hepática crônica. Essa avaliação pode ser feita através da biópsia hepática (padrão-ouro) utilizando o	Resultado de biópsia hepática, ou elastografia hepática por Fibroscan® ou ARFI utilizando os valores de ponto de corte estipulados para cada grau de fibrose, com valores iguais ou superiores à F3 de Metavir.	F3 F4

	escore de Metavir. Formas não invasivas de avaliação incluem a elastografia por Fibroscan® e ARFI.		
HCV RNA	Variável contínua, fornecida em Teste de detecção dos ácidos nucleicos do vírus da hepatite C	Teste coletado no laboratório do HC-UFPE e realizado no laboratório Genoma –SP. Considerado positivo se detectar a presença de mais de 12 cópias do RNA viral	Variável categórica ordinal: -Negativo -Carga viral baixa (<400.000 UI/mL) -Carga viral alta (> 400.000 UI/mL)
Genótipo do vírus C	Variável qualitativa. Categoria genotípica do vírus C	Resultado de exame de genotipagem coletado no laboratório do HC-UFPE	Variável categórica nominal: 1, 2, 3, 4, 5 ou 6
Tratamento prévio da Hepatite C	Variável dicotômica Uso anterior de algum tipo de esquema para hepatite C, com Interferon convencional e/ou Peguilado , RBV,	Questionado ao paciente em entrevista se já realizou tratamento prévio, qual foi e por quanto tempo e a informação foi checada em	Variável dicotômica: -SIM -NÃO

	Telaprevir ou Boceprevir	consulta de prontuário	
Duração do tratamento prévio	Duração em meses do uso de tratamento para Hepatite C.	Questionado ao paciente o tempo de duração dos esquemas terapêuticos prévios e a informação foi verificada em prontuário.	Variável discreta: Quantidade total de meses de uso de todos os tratamentos prévios realizados contra o HCV.
Tempo de uso de alfa-interferon	Duração em meses do uso de alfa-interferon	Informação verificada em prontuário	Variável discreta: Quantidade total de meses de uso de alfa-Interferon
Tempo de uso de ribavirina	Duração em meses do uso de RBV	Informação verificada em prontuário	Variável discreta: Quantidade total de meses de uso de RBV
Usou Telaprevir	Uso de Telaprevir associado à PEG e RBV em algum dos esquemas de tratamento	Informação verificada em prontuário	Variável categórica dicotômica: SIM NÃO
Recidiva pós tratamento prévio	Variável qualitativa. O paciente foi considerado recidivante se apresentou carga	Avaliação de prontuário buscando informações sobre o tratamento prévio (HCV RNA	Variável categórica dicotômica: SIM NÃO

	viral positiva após carga viral negativa no fim do tratamento	durante e ao fim do mesmo)	
Tempo decorrido do tratamento prévio	Tempo em meses transcorrido entre o fim do tratamento prévio e o início do uso dos antivirais de ação direta	Entrevista com o paciente e verificação nos dados do prontuário	Variável discreta: Em meses. Nos casos em que não houver informação do mês de conclusão de tratamento, consideraremos arbitrariamente que isso aconteceu em junho do ano de tratamento descrito no prontuário
Resposta ao tratamento com os DAAs	Variável qualitativa. Quantificação do HCV RNA na 12ª semana após o fim do tratamento	Teste molecular coletado no laboratório do Hospital das Clínicas, realizado no laboratório Genoma – SP, considerado positivo se detectar a presença de	Variável dicotômica Respondedor Não respondedor

		cópias do RNA viral	
Esquema com DAAs utilizado para o tratamento da Hepatite C	Variável qualitativa. Esquema de drogas utilizado para o tratamento da hepatite C, escolhido com base em genótipo, presença de cirrose ou outras condições, de acordo com o protocolo do MS	Avaliação do esquema de medicações indicado em prontuário e que consta na caderneta da Farmácia do Estado	Variável categórica nominal: 1) Sofosbuvir+RBV; 2) Sofosbuvir +Daclatasvir+RBV; 3) Sofosbuvir + Daclatasvir; 4) Sofosbuvir +Simeprevir; 5) Sofosbuvir + Simeprevir+RBV
RBV no tratamento atual	Uso de RBV associada aos DAAs	Avaliação do esquema de medicações indicado em prontuário e que consta na caderneta da Farmácia do Estado	Variável categórica dicotômica: SIM NÃO

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. As variáveis numéricas estão representadas pelas medidas de tendência central e de dispersão.

As variáveis contínuas foram resumidas em termos de mediana ou média  $\pm$  desvio padrão (DP) e as variáveis categóricas através de frequências absolutas e percentagens. Os resultados estão apresentados em forma de tabela com suas respectivas frequências absoluta e relativa. A fim de verificar a existência de associação entre as variáveis foram utilizados o Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. Foi utilizado o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov para variáveis quantitativas ( $n \geq 30$ ). Na comparação entre dois grupos foram utilizados Teste t de Student (distribuição normal) e Mann-Whitney (distribuição não normal).

## 2.9 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa seguiu as orientações da Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. A coleta de dados só foi iniciada após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o CAAE 58349916.1.0000.5208 (Anexo A). Aos pacientes que aceitaram participar, foram fornecidas as orientações necessárias e a garantia de liberdade em não participar da pesquisa ou sair dela a qualquer momento sem que seu acompanhamento no serviço ou seu tratamento sofresse nenhum prejuízo. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi baseado nas orientações do comitê de ética de pesquisa em seres humanos do Hospital das Clínicas da UFPE.

Os pacientes poderiam sentir-se constrangidos em prestar informações sobre seus sintomas e dados da sua doença e poderiam ficar ansiosos pela realização de exames de acompanhamento. Os mesmos eram orientados a comunicar a pesquisadora para que fossem tomadas as devidas providências, como receber orientações, a qualquer momento, sobre a necessidade de realizar os exames de acompanhamento e a garantia de confidencialidade sobre os dados fornecidos. A coleta de sangue foi realizada por flebotomista experiente, minimizando assim o risco de dor ou desconforto.

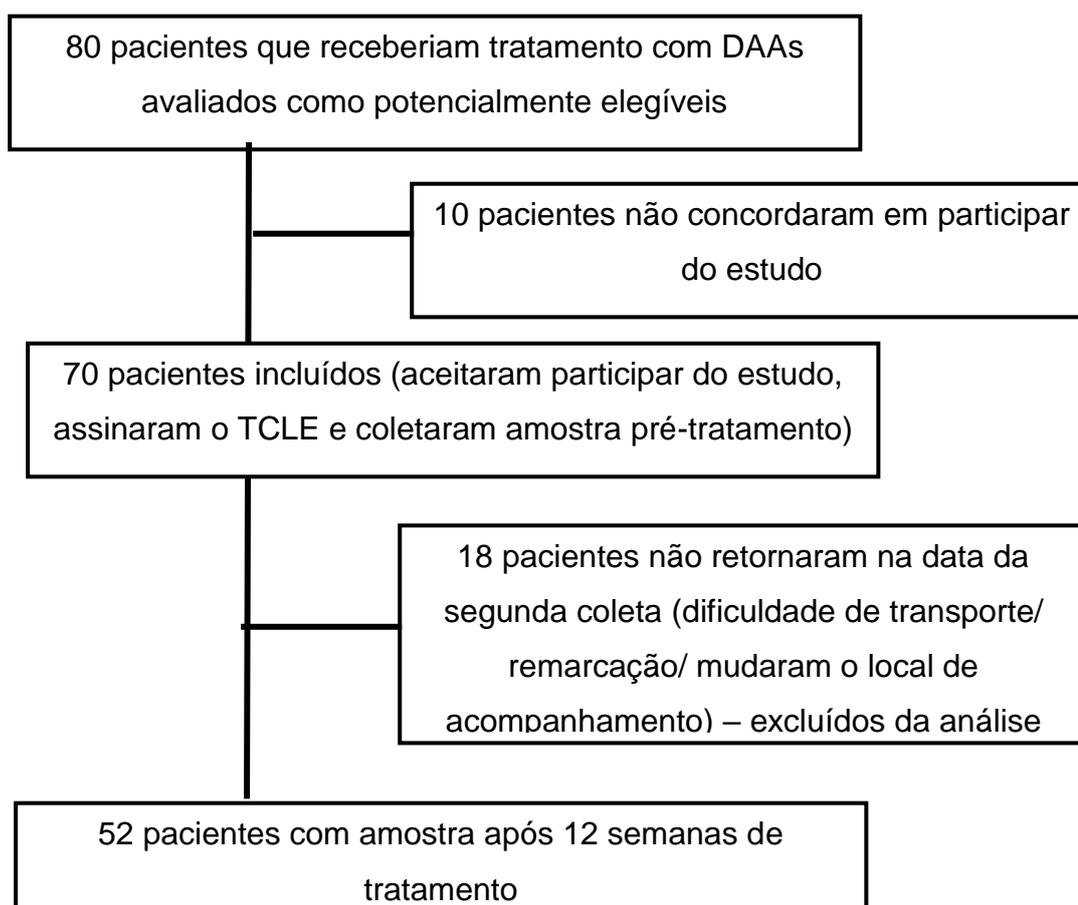
Como em toda pesquisa com seres humanos, há o risco de perda de dados e quebra do sigilo. Reitera-se o compromisso ético dos pesquisadores com o armazenamento seguro e sigilo dos dados coletados.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Durante o período de um ano (Setembro de 2016 a Setembro de 2017) foram avaliados 80 pacientes potencialmente elegíveis, conforme Figura 4. Foram entrevistados e realizada coleta de soro pré-tratamento com DAAs de 70 pacientes. Trinta e sete pacientes (52,9%) eram do sexo masculino. A média de idade foi de 60,99 anos ( $\pm$  10,9 anos).

Figura 4- Diagrama da população estudada



O genótipo mais prevalente foi o 1, presente em 50 dos 70 pacientes (71,4%). Quarenta e seis pacientes (65,7%) tinham HCV RNA pré-tratamento maior que 400.000 UI/ml. Dos 70 pacientes, cinco (7,1%) eram coinfectados HIV-HCV. Trinta e

sete dos 70 pacientes (52,9%) possuíam algum exame (biópsia hepática, elastografia hepática por ARFI ou por Fibroscan®) dos últimos 2 anos evidenciando estágio de fibrose significativa (F2 a F4). A Tabela 1 contém os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos 70 pacientes do estudo.

**Tabela 1** – Características clínicas e laboratoriais dos 70 pacientes com hepatite C crônica antes do tratamento com os novos antivirais (DAAs), Recife, 2018.

<b>Característica</b>	<b>n = 70</b>
<b>Demográficas</b>	
Idade (média $\pm$ DP) em anos	60,99 ( $\pm$ 10,9)
Sexo Masculino	37(52,9)
<b>Genótipo do HCV</b>	
1	50 (71,4)
2 e 3	20 (28,6)
<b>Clínicas</b>	
HCV RNA > 400.000 UI/ml	46 (65,7)
Fibrose significativa (F2-F4)	37 (52,9)
Fibrose avançada (F3-F4)	28 (40)
Cirrose hepática	22 (31,4)
Diabetes Mellitus 2	19 (27,1)
Esquistossomose hepatoesplênica	14 (20,6)
Coinfecção HIV	5 (7,1)
Uso de Tenofovir ou Lamivudina	5 (7,1)
LES	1(1,5)
Uso de MMF	1(1,5)
Uso de Azatioprina	1(1,5)
Uso de Aciclovir	0

Valores apresentados como n (%) exceto quando indicado. Abreviações: HCV, vírus da hepatite C; HCV RNA: quantificação da carga viral por PCR em tempo real; HIV, vírus da imunodeficiência humana; LES, Lúpus eritematoso sistêmico; MMF, Micofenolato de mofetila; RBV, Ribavirina,

Com relação aos tratamentos prévios contra o HCV, 34 dos 70 pacientes (48,6%) já haviam utilizado algum esquema terapêutico, sendo que seis deles fizeram duas tentativas e quatro deles três tentativas, com 36 pacientes (51,4%) virgens de tratamento antiviral. Quatro desses 70 pacientes (5,8%) receberam esquema com telaprevir. Recidiva após os esquemas prévios foi observada em 13 participantes do estudo (18,6%). A associação de PEG e RBV foi o esquema mais realizado, utilizado no mínimo uma vez por 31 pacientes em 38 (79,1%) dos 48 tratamentos prévios.

A média de tempo desde o último tratamento recebido foi de 85,48 meses ( $\pm 57,5$  meses). A média de tempo total de uso das medicações de cada indivíduo foi de 16,39 meses ( $\pm 19$  meses). O tempo médio de uso de RBV de cada um foi de 15,7 meses ( $\pm 18,9$  meses) enquanto que o tempo médio de uso de alfa-interferon (incluindo peguilado e convencional) foi de 11,68 meses ( $\pm 7,9$  meses).

Com relação ao tratamento com DAAs, 65 (92,9%) dos 70 pacientes receberam as medicações por 12 semanas. O esquema mais utilizado foi Sofobuvir 400mg + Simeprevir 150mg, usado por 34 pacientes (48,6%). Dezesesseis dos 70 pacientes (22,9%) receberam RBV associada aos DAAs. A Tabela 2 contém os dados sobre os tratamentos prévios e com uso de DAAs dos 70 pacientes do estudo.

**Tabela 2** – Características dos tratamentos prévios e com uso de DAAs dos 70 pacientes com hepatite C crônica submetidos ao tratamento com os novos antivirais (DAAs), Recife, 2018.

<b>Característica</b>	<b>n = 70</b>
<b>Tratamento Prévio do HCV</b>	
Não realizado	36(51,4)
Realizado	34(48,6)
Recidivantes	13 (18,6)
Tratou mais de uma vez	10(14,3)
Tempo em meses desde o tratamento prévio (média $\pm$ DP)	85,48 ( $\pm 54,5$ )
Tempo total em meses de tratamento (média $\pm$ DP)	16,39 ( $\pm 19$ )
Tempo em meses de uso de RBV (média $\pm$ DP)	15,7 ( $\pm 18,9$ )
Tempo em meses de uso de IFN-alfa (média $\pm$ DP)	11,68 ( $\pm 7,9$ )
<b>Esquema utilizado</b>	
Associação PEG + RBV	31 (44,28)
Uso de Telaprevir	4 (5,8)
<b>Tratamento com os novos DAAs</b>	
Sofosbuvir + Simeprevir	34(48,6)
Sofosbuvir + Daclatasvir	20(28,5)
Sofosbuvir + Daclatasvir + Ribavirina	12(17,1)
Sofosbuvir + Ribavirina	2(2,9)
Sofosbuvir + Simeprevir + Ribavirina	2(2,9)
RBV no tratamento atual	16(22,9)

Valores apresentados como n (%) exceto quando indicado. Abreviações: RBV, Ribavirina, IFN: Interferon; PEG: Interferon-Peguilado; DAAs, antivirais de ação direta;

### 3.2 ANTI-ANÉIS E BASTÕES NA AMOSTRA PRÉ-TRATAMENTO

O anti-RR foi detectado em 16 dos 70 pacientes (22,8%) na amostra pré-tratamento. A média de idade entre os pacientes com anti-RR positivo foi de 65,4 anos ( $\pm 10,5$ ) e entre os negativos de 59,6 anos ( $\pm 10,8$ ) ( $p=0,064$ ). O genótipo 1 foi o mais comum entre os positivos, presente em 12 dos 16 pacientes (75%). Nenhum dos coinfectados HIV-HCV foi positivo na amostra antes do tratamento ( $p=0,582$ ). Não houve relação significativa entre sexo, genótipo, carga viral, estágio de fibrose, diagnóstico de cirrose, co-infecção com HIV, esquistossomose ou diabetes com a presença do anticorpo. Houve tendência a diferença significativa na média de idade entre o grupo com e sem o anti-RR. A Tabela 3 contém as características clínicas dos pacientes com hepatite c de acordo com a positividade do anti-RR antes do tratamento antiviral.

**Tabela 3-** Características clínicas dos 70 pacientes com hepatite C crônica de acordo com a positividade dos anticorpos anti-anéis e bastões antes do tratamento com os novos antivirais (DAAs). Recife, 2018.

<b>Característica</b>	<b>Anti-RR positivo n=16</b>	<b>Anti-RR negativo n=54</b>	<b>p</b>
<b>Sexo Masculino</b>	8 (50)	29 (53,7)	0,794 <sup>1</sup>
<b>Idade (média <math>\pm</math>DP)</b>	65,4 $\pm$ 10,5	59,6 $\pm$ 10,8	0,064 <sup>3</sup>
<b>Genótipo 1</b>	12 (75)	38 (70,4)	1,000 <sup>2</sup>
<b>HCV RNA &gt; 400.000UI</b>	10 (62,5)	36 (66,6)	1,00 <sup>1</sup>
<b>Fibrose significativa nos últimos 2 anos</b>	9 (56,2)	28 (51,8)	0,315 <sup>2</sup>
<b>Fibrose avançada nos últimos 2 anos</b>	6 (37,5)	22 (40,7)	1,000 <sup>2</sup>
<b>Cirrose hepática</b>	6 (37,5)	16 (29,6)	0,615 <sup>1</sup>
<b>DM2</b>	5 (31,2)	14 (25,9)	0,757 <sup>2</sup>
<b>EHE</b>	3 (18,7)	11 (20,3)	1,00 <sup>2</sup>

<b>HIV</b>	0	5 (9,2)	0,582 <sup>2</sup>
------------	---	---------	--------------------

Valores apresentados como n (%) exceto quando indicado. 1: Teste de Qui-quadrado de Pearson; 2: teste exato de Fisher; 3: teste t de Student; Abreviações: Anti-RR: Anti-anéis e bastões; HCV RNA: quantificação da carga viral por PCR em tempo real; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; DM2, Diabetes Mellitus tipo 2; EHE: Esquistossomose hepatoesplênica

A realização de tratamento prévio contra a o HCV apresentou forte associação com o surgimento do anticorpo ( $p=0,000$ ). Todos os 16 pacientes com anti-RR positivo haviam recebido pelo menos um esquema terapêutico prévio contra o HCV, com quatro deles (25%) tendo recebido mais de uma vez e dois deles (12,5%) tendo recebido três vezes. Oito dos 16 pacientes com anticorpo positivo (50%) haviam apresentado recidiva a algum desses tratamentos ( $p=0,213$ ) e os outros oito eram não-respondedores. A Tabela 4 contém as características dos tratamentos prévios dos pacientes com hepatite C de acordo com a positividade do anti-RR antes do tratamento antiviral.

**Tabela 4 - Características dos tratamentos prévios dos 70 pacientes com hepatite C crônica de acordo com a positividade dos anticorpos anti-anéis e bastões antes do tratamento com os novos antivirais (DAAs). Recife, 2018**

<b>Característica</b>	<b>Anti-RR positivo (n=16)</b>	<b>Anti-RR negativo (n=54)</b>	<b>p</b>
<b>Realizou tratamento</b>	16 (100)	18 (33,3)	0,000 <sup>1</sup>
<b>Recidiva em algum tratamento</b>	8 (50)	5 (9,4)	0,213 <sup>1</sup>
<b>Usou telaprevir</b>	3 (18,7)	1(1,9)	0,035 <sup>2</sup>
<b>Tempo médio desde o tratamento anterior (em meses)</b>	82	88,3	0,756 <sup>3</sup>
<b>Tempo médio de tratamento (em meses)</b>	22,2	10,9	0,100 <sup>3</sup>
<b>Tempo médio de uso de IFN-<math>\alpha</math> (em meses)</b>	12,47	10,9	0,603 <sup>3</sup>
<b>Mediana de tempo de uso de RBV (meses)</b>	14,5	9,0	0,04 <sup>4</sup>

Valores apresentados como n (%) exceto quando indicado. . 1: Teste de Qui-quadrado de Pearson; 2: teste exato de Fisher; 3: teste t de Student; 4: Mann-Withney. Abreviações: IFN- $\alpha$ , alfa- Interferon; RBV, Ribavirina;

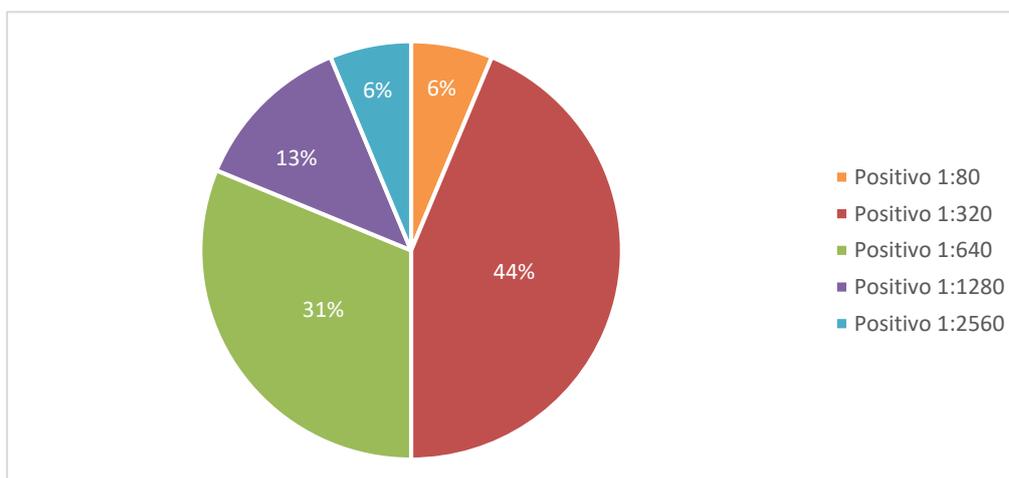
Três dos 16 pacientes (18,8%) com anticorpo positivo haviam utilizado telaprevir, enquanto apenas um dos 54 negativos (1,9%) recebeu ( $p=0,035$ ), sugerindo uma relação significativa do uso dessa droga com o surgimento do anticorpo. Não houve relação entre a média de tempo de tratamento prévio (22,2 meses *versus* 10,9 meses;  $p=0,100$ ) nem média de tempo de uso de IFN (12,4 meses *versus* 10,9 meses;  $p=0,603$ ) no surgimento do anti-RR. Já a mediana de tempo prévio de uso de RBV, que mostrou relação significativa com o surgimento do anticorpo, foi entre os positivos de 14,5 meses e entre os negativos de 9 meses ( $p=0,04$ ). A média de tempo transcorrido desde o último tratamento foi próxima nos dois grupos e não foi significativo para o surgimento do anticorpo (82 meses *versus* 88,3 meses;  $p=0,756$ ).

Uma paciente utilizava micofenolato de mofetil como imunossupressor e outro utilizava azatioprina, ambos após transplante renal. Os dois apresentaram anticorpo negativo. Nenhum paciente utilizava metotrexato nem aciclovir. Os cinco pacientes coinfectados com HIV utilizavam tenofovir e lamivudina em seu esquema antirretroviral.

### 3.2.1 Títulos dos anticorpos na amostra pré-tratamento

Sete dos 16 pacientes (43,75%) apresentaram título do anticorpo de 1:320. O maior título encontrado foi 1:2.560, em um paciente. A distribuição dos títulos encontra-se no Gráfico 1.

**Gráfico 1-** Títulos dos anticorpos anti-anéis e bastões dos 16 pacientes com hepatite C crônica tratados com os novos antivirais que apresentaram o anticorpo na amostra pré-tratamento



### 3.3 ANTI-ANÉIS E BASTÕES NA AMOSTRA APÓS 12 SEMANAS DE TRATAMENTO ANTIVIRAL

A coleta após 12 semanas de tratamento com DAAs foi realizada em 52 pacientes. O anti-RR foi detectado em 14 desses pacientes (26,92%), com 11 deles já tendo apresentado o anti-RR na amostra pré-tratamento. Em três dos 52 pacientes (5,7%) o anticorpo surgiu durante o tratamento com os DAAs, pois os mesmos eram negativos na amostra inicial. Os dados dos pacientes em que ocorreu surgimento do anticorpo após o tratamento estão no Quadro 4.

**Quadro 4-** Características dos três pacientes em que ocorreu surgimento dos anticorpos anti-anéis e bastões após 12 semanas de tratamento com os novos antivirais (DAAs)

Paciente	Título	Genótipo	Tratamento prévio	Resposta	HIV	DAAs	Duração
GMS	1:80	1b	PEG RBV por 11 meses	Recidivante	Não	SOF + SIM + RBV	12 semanas
SMA	1:80	1a	PEG RBV por 18 meses	Nula	Sim	SOF + DAC	24 semanas
ALJ	1:40	3	Nenhum	-	Não	SOF + DAC + RBV	12 semanas

Siglas: PEG: Interferon Peguilado. RBV: Ribavirina; SOF: Sofosbuvir; SIM: Simeprevir; DAC: Daclatasvir.

A paciente GMS é do sexo feminino, havia recebido PEG e RBV por 11 meses em 2015, tendo apresentado recidiva após esse esquema. ARFI de 2016 evidenciou estágio de fibrose F4. Recebeu SOF + SIM + RBV por 12 semanas com cura após o fim do tratamento. O paciente SMA é do sexo masculino, co-infectado HIV-HCV. Utilizou PEG + RBV por 18 meses em 2005 sem resposta à terapia. Usou SOF + DAC com HCV RNA negativo ao fim do tratamento.

A paciente ALJ é do sexo feminino. Nunca havia sido tratada antes. Apresenta HCV genótipo 3 e estágio de fibrose F4 pelo ARFI de 2016, ambas características

associadas pior resposta ao tratamento, por isso recebeu RBV associada ao esquema com SOF + DAC por 12 semanas. Apresentou o Anti-RR em títulos baixos. Ao fim do tratamento seu HCV RNA permanecia positivo indicando falha terapêutica. Nenhum dos três pacientes acima citados possuía doença autoimune diagnosticada nem uso de outras drogas que pudessem induzir os anti-RR.

Ao comparar os pacientes com anti-RR positivos e negativos nessa amostra após 12 semanas de DAAs, verificou-se que o uso de tratamento prévio contra o HCV (92,9% vs 26,3%,  $p=0,000$ ) e o tempo de uso de ribavirina previamente (mediana de 17,5 meses vs 6 meses,  $p = 0,05$ ) foram novamente relacionados à presença do anticorpo. O uso de RBV associada aos DAAs não foi significativo para o surgimento do anti-RR nessa amostra (28,6% vs 21,1%,  $p=0,712$ ). A presença de anti-RR positivo na amostra inicial também foi significativa, presente em 78,6% dos positivos e nenhum dos negativos ( $p=0,000$ ). A Tabela 5 contém as principais características sobre os tratamentos atual e prévios dos pacientes com hepatite C de acordo com a positividade do anti-RR após 12 semanas de uso do tratamento antiviral.

**Tabela 5-** Características dos tratamentos atual e prévios dos 52 pacientes com hepatite C crônica de acordo com a positividade dos anticorpos anti-anéis a bastões após 12 semanas de uso do dos novos antivirais (DAAs). Recife, 2018.

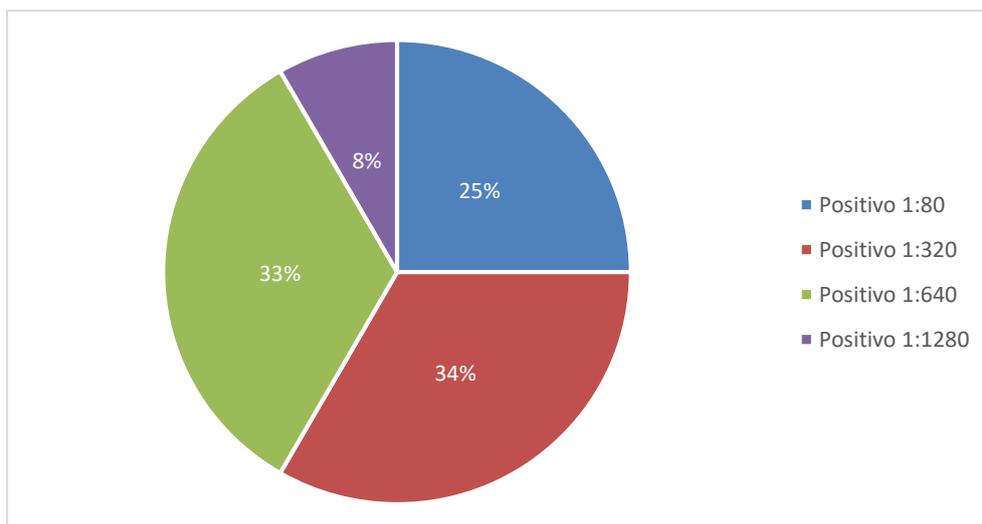
<b>Característica</b>	<b>Anti-RR positivo (n=14)</b>	<b>Anti-RR negativo (n=38)</b>	<b>p</b>
<b>RBV no tto atual</b>	4(28,6)	8(21,1)	0,712 <sup>2</sup>
<b>Anti-RR positivo na amostra inicial</b>	11(78,6)	0	0,000 <sup>2</sup>
<b>Realizou tratamento prévio</b>	13(92,9)	10(26,3)	0,000 <sup>1</sup>
<b>Usou telaprevir anteriormente</b>	1(7,1)	0	0,269 <sup>2</sup>
<b>Mediana de tempo de uso de RBV prévio (meses)</b>	17,5	6	0,05 <sup>3</sup>

Valores apresentados como n (%) exceto quando indicado. 1: Teste de Qui-quadrado de Pearson; 2: teste exato de Fisher; 3: Mann-Whitney Abreviações: Anti-RR: Anti-anéis e bastões; RBV, Ribavirina;

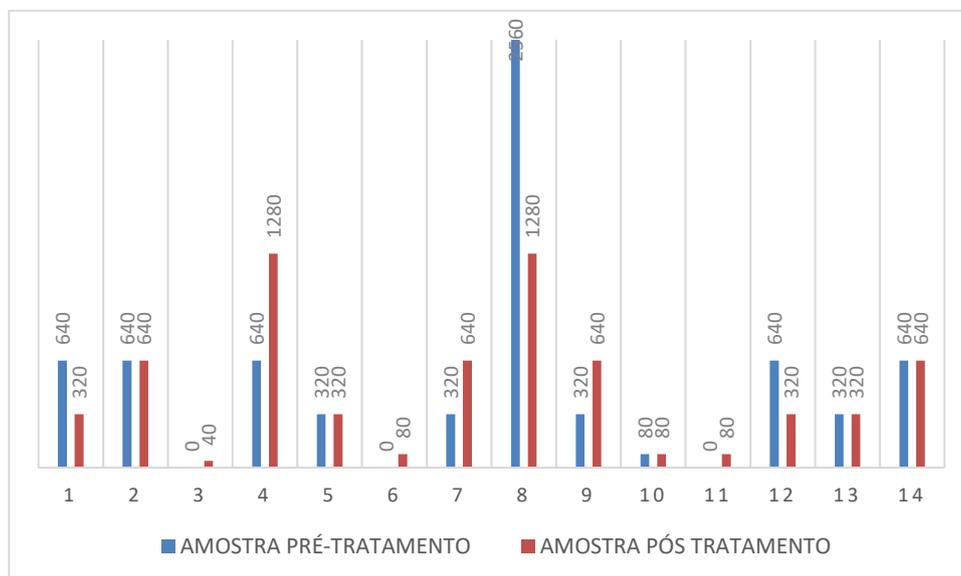
### 3.3.1 Títulos dos anticorpos na amostra após 12 semanas de tratamento antiviral

Na amostra após 12 semanas de tratamento, predominaram os títulos de 1:320 e 1:640. O valor máximo foi 1:1.280. Em seis dos 52 pacientes (11,53%) os títulos do anti-RR subiram após 12 semanas de uso do esquema com DAAs. Em três o anticorpo era negativo e tornou-se positivo e em três os títulos eram positivos e aumentaram. Três utilizaram RBV associada aos DAAs. Cinco desses pacientes tinham tratamento prévio com IFN- $\alpha$  e RBV. O Gráfico 2 mostra a distribuição por títulos dos anti-RR na amostra após 12 semanas de tratamento com DAAs e o Gráfico 3 mostra o comportamento dos títulos no início e após 12 semanas nesses 14 pacientes.

**Gráfico 2-** Títulos dos anti-anéis e bastões dos 14 pacientes com hepatite C crônica tratados com DAAs que apresentaram o anticorpo anti-anéis e bastões após 12 semanas de tratamento com os novos antivirais (DAAs). Recife, 2018.



**Gráfico 3-** Comportamento dos títulos dos anticorpos anti-anéis e bastões (anti-RR) na amostra antes e após 12 semanas de tratamento nos 14 pacientes com anti-RR positivo após 12 semanas de uso dos novos antivirais (DAAs)



Os pacientes 1, 8 e 12 apresentaram queda nos títulos, os pacientes 2, 5, 10, 13 e 14 mantiveram os mesmos títulos da amostra inicial. Já os pacientes 3, 6, 11, 4, 7 e 9 apresentaram aumento nos títulos, sendo que os 3 primeiros eram negativos na amostra pré-tratamento.

### 3.4 RESPOSTA AO TRATAMENTO COM DAAS

Em 62 dos 70 pacientes (88,5%) realizou-se a pesquisa do HCV RNA na 12ª semana após o fim do tratamento para avaliar a resposta virológica sustentada, e em 59 deles (95,1%) o resultado foi negativo. Este estudo foi concluído antes da 12ª semana após o término do tratamento em 8 pacientes. Dentre todos os pacientes com anti-RR positivo, apenas um (cujo anticorpo surgiu após as 12 semanas de uso dos DAAs) não respondeu ao tratamento.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, 16 dos 70 pacientes da amostra inicial (22,8%) apresentaram o anti-RR antes de receber o esquema terapêutico com os novos DAAs. Após as 12 semanas de uso dessas medicações, 5,7% dos pacientes apresentaram surgimento desse anticorpo. A presença do anti-RR esteve relacionada à terapia prévia contra o HCV, posto que esse anticorpo foi detectado em 16 dos 34 pacientes com tratamento prévio (47%) e nenhum dos 36 virgens de tratamento. Conforme a literatura, entre os pacientes que fazem uso de PEG e RBV, o anti-RR é encontrado em aproximadamente 25% dos casos (CALISE et al., 2016; DAMMERMANN et al., 2017; KEPPEKE et al., 2012; NOVEMBRINO et al., 2014). Stinton *et al* evidenciaram o anticorpo em apenas 4,7% dos pacientes em seu estudo, porém a maioria de sua população não tinha uso prévio de PEG e RBV (STINTON et al., 2013).

Um estudo populacional evidenciou a presença do anti-RR em 39 de 4738 indivíduos analisados (0,74%), dos quais apenas um tinha hepatite C, evidenciando que esse anticorpo pode surgir na população sem uso de PEG e RBV (SHAIKH et al, 2013). Dados de estudo de Keppeke *et al.* sugerem que o anti-RR surge em aproximadamente 40% dos pacientes tratados uma vez com IFN- $\alpha$  e RBV e em 70% dos tratados por duas ou 3 vezes (KEPPEKE et al., 2016b). No presente estudo, foi encontrada uma frequência de 41,6% de anti-RR nos pacientes tratados uma vez, 46% nos tratados duas vezes e 47% nos tratados três vezes.

A média de tempo desde o último tratamento contra o HCV foi longa, de 85,4 meses. Como os tratamentos com PEG e RBV eram longos e com muitos efeitos colaterais, talvez muitos pacientes tenham recusado novas tentativas. Porém, mesmo apesar desse longo tempo decorrido entre o último tratamento e a coleta de soro, foi encontrada frequência de anti-RR nos pacientes previamente tratados acima da descrita em outros estudos, que demonstravam tendência do desaparecimento do anti-RR com o passar dos anos. O grupo de Keppeke evidenciou desaparecimento do anti-RR em metade dos pacientes após seis meses do fim do tratamento (KEPPEKE et al., 2012). Já Novembrino *et al.* evidenciaram esse desaparecimento em 80% dos casos após um ano (NOVEMBRINO et al., 2014). Contudo, na literatura pesquisada nenhum estudo publicado avaliou a presença desse anticorpo nos pacientes tanto tempo após o tratamento prévio.

Sabe-se que a resposta imune que leva ao surgimento dos anti-RR é semelhante àquela que ocorre diante de uma infecção, porém mais lenta, iniciando após meses do estímulo (KEPPEKE et al., 2014). Nos casos de resposta imune à infecção ou outros antígenos externos, após o fim do estímulo antigênico, os plasmócitos de vida longa mantêm baixos níveis plasmáticos de IgG específica para aquele antígeno, fazendo com que a positividade do anticorpo gerado possa durar por anos. Porém no caso das doenças autoimunes, já foi demonstrado que pode haver flutuações nos níveis de autoanticorpos detectado por IFI ou outros métodos, de forma independente de tratamento ou atividade da doença (CZAJA, 1999; FARIA; BARCELLOS; ANDRADE, 2005). Não se sabe se isso ocorre por ser parte da história natural dessas doenças ou se por limitações nestes métodos de avaliação de anticorpos.

Acreditamos que a detecção dessa frequência alta de anti-RR após tantos anos sem contato com seu provável estímulo causador, a RBV, tenha ocorrido não só pela persistência da produção dos anticorpos pelos plasmócitos de vida longa mas também pelo fato de que 37,5% dos pacientes deste estudo receberam mais de um esquema prévio com PEG e RBV. Nos trabalhos de Keppeke e Novembrino, esse anticorpo desapareceu com o passar do tempo, porém os pacientes foram tratados apenas uma vez. Talvez o tempo maior de exposição às drogas tenha levado à uma resposta imune mais persistente. Além disso, o padrão flutuante de autoanticorpos visto em outras patologias poderia se aplicar nos casos dos anti-RR e um percentual de positividade diferente pudesse ter sido encontrado em análises desses dois autores após período mais prolongado.

Apesar de não ter havido significância estatística, a média de tempo de tratamento prévio dos pacientes com anti-RR positivo na amostra pré-tratamento foi o dobro dos pacientes negativos. A maior frequência do anticorpo em pacientes com maior duração de tratamento já foi descrita em estudos anteriores (KEPPEKE et al., 2012; NOVEMBRINO et al., 2014). Estudo que avaliou a presença do anti-RR usando células mononucleares periféricas de 17 pacientes com HCV e uso de PEG e RBV encontrou correlação entre a frequência do anti-RR e a duração do tratamento ( $r=0,55$ ;  $p=0,01$ ) (KEPPEKE et al., 2016a).

Com relação ao tempo de uso prévio de ribavirina houve associação positiva entre maior tempo de uso e surgimento do anti-RR. Com efeito, Novembrino *et al.* já haviam encontrado relação positiva da média da dose de RBV com o surgimento dos

anti-RR (1000mg nos positivos vs 800mg nos negativos,  $p=0,04$ ), mas esse efeito foi excluído pela regressão logística multivariada (NOVEMBRINO et al., 2014). Já os dados sobre relação entre o aparecimento do anti-RR e o tempo de uso de RBV são escassos. Não observamos relação entre o tempo prévio de uso de IFN- $\alpha$  e o surgimento dos anticorpos.

Já o uso de RBV associada aos DAAs não foi um fator significativo para o surgimento do anticorpo. Talvez não se tenha encontrado uma relação mais consistente em virtude da curta duração do tratamento e do pequeno número de pacientes utilizando associação dessas drogas. Cabe ressaltar que a maioria da amostra não apresentava fatores de mau prognóstico que indicassem associação da ribavirina aos DAAs.

Surpreendentemente, encontrou-se associação positiva entre o uso de telaprevir e o surgimento dos anti-RR na amostra pré-tratamento. Porém devido ao pequeno número de pacientes que utilizaram essa droga (quatro ao todo), acredita-se que mais estudos sejam necessários para confirmar essa associação. Esses três pacientes com uso de telaprevir tinham uma média de tempo de tratamento prévio e de uso de RBV de 17,3 meses, sendo talvez esse o fator associado à positividade do anticorpo. Calise *et al.* avaliaram 52 pacientes usando PEG, RBV e telaprevir, encontrando uma frequência de anti-RR de 19%. Já Dammermann *et al.* avaliaram 37 pacientes recebendo PEG, ribavirina e boceprevir e 67 recebendo PEG, ribavirina e telaprevir, encontrando uma frequência de anti-RR de 46% e 32% respectivamente. Estes estudos concluíram que o boceprevir e telaprevir não tinham influência no surgimento dos anti-RR (CALISE et al., 2016; DAMMERMANN et al., 2017)

No grupo de 52 pacientes avaliados após 12 semanas de uso dos DAAs, o anticorpo foi encontrado em 14 deles (26,9%), sendo que destes, 3 desenvolveram o anticorpo após o início do tratamento com DAAs (pacientes GMS, SMA e ALJ, descritos no Quadro 4). Dois desses 3 pacientes (GMS e ALJ) estavam em uso de RBV associada aos DAAs, mas o paciente SMA usou apenas SOF + DAC.

Cabe salientar que os pacientes GMS e SMA já haviam feito tratamento prévio com PEG e RBV. Assim, não se pode eliminar por completo o envolvimento dessas drogas na indução do anti-RR nestes dois casos, podendo ter se tratado na verdade um reaparecimento do anticorpo. Na paciente GMS foi utilizada novamente a RBV no esquema com DAAs e talvez a reexposição a essa droga tenha sido suficiente para induzir o aparecimento (ou reaparecimento) do anti-RR durante este tratamento em

uma paciente já sensibilizada. No paciente SMA, sem uso recente de RBV, o que estimulou o aparecimento ou reaparecimento do anticorpo não foi esclarecido.

No caso do paciente SMA, talvez o próprio tratamento com sofosbuvir e daclatasvir tenha sido o gatilho para o aparecimento do anticorpo anti-RR. Este paciente é coinfestado com o vírus HIV e também utilizava Lamivudina e Tenofovir em seu esquema antiretroviral. Estudo realizado por Keppeke *et al.* demonstrou que essas drogas não parecem ter capacidade de induzir o anti-RR *in vitro* nem *in vivo*. Dentre as demais drogas que demonstraram induzir esse anticorpo *in vivo* (azatioprina, metotrexato, ácido micofenólico e aciclovir), (KEPPEKE *et al.*, 2016a) apenas uma paciente utilizava o micofenolato de mofetil (um pré-fármaco do ácido micofenólico) mas não apresentou surgimento do anticorpo. Em adição, a presença de coinfeccção HIV-HCV também não parece ter influência no surgimento dos anticorpos. (KEPPEKE *et al.*, 2012)

Na paciente ALJ, em que não havia história de tratamento prévio contra o HCV, o anti-RR ocorreu provavelmente devido ao uso da RBV. Talvez, o percentual de ocorrência do anti-RR neste estudo não tenha sido maior em virtude tanto da ausência do PEG, cujos efeitos na imunidade podem ter influência no surgimento do anticorpo, quanto do menor tempo de tratamento com os DAAs. Os pacientes deste estudo foram avaliados após 12 semanas de uso das medicações, tempo menor em relação ao previamente realizado com PEG e ribavirina (24 a 72 semanas). Isso porque o aparecimento do anti-RR tem sido descrito com maior frequência no 6º mês de tratamento, com maiores títulos no 12º mês de uso da medicação (CALISE *et al.*, 2016; CLIMENT *et al.*, 2015; KEPPEKE *et al.*, 2014).

No estudo de Novembrino *et al.*, envolvendo 88 pacientes tratados com PEG e RBV, a frequência de anti-RR positivo nos 3º, 6º e 12º mês foi de, respectivamente, 9%, 38% e 53% ( $p=0,008$ ) (NOVEMBRINO *et al.*, 2014). Estudo de Keppeke *et al.* evidenciou que 8 de 17 pacientes apresentaram surgimento do anti-RR no 6º mês de tratamento ou mais, com 7 deles apresentando no 9º mês ou após isso. (KEPPEKE *et al.*, 2012). Um outro estudo analisou amostras de soro de 15 indivíduos com hepatite pelo HCV, que apresentaram o anticorpo e foi verificado que a intensidade de imunoprecipitação do IMPDH2 teve seu pico entre 6-12 meses de uso de PEG e RBV, com posterior queda no pós-tratamento (KEPPEKE *et al.*, 2014).

Não foi observada associação entre a presença do anti-RR e parâmetros demográficos como sexo, coinfeccção com HIV, carga viral pré-tratamento e o

genótipo do HCV, como já mencionado em estudos publicados (CALISE et al., 2016; CARCAMO et al., 2013; KEPPEKE et al., 2012; NOVEMBRINO et al., 2014). A maior frequência do genótipo 1 também foi vista nos demais estudos, por ele ser o genótipo mais prevalente no mundo (MESSINA et al., 2015). Essas variáveis não parecem exercer influência no surgimento desse anticorpo. Não observamos relação com grau de fibrose, presença de esquistossomose hepatoesplênica e presença de diabetes mellitus. Apesar de alguns desses fatores serem capazes de induzir imunossupressão, aparentemente não ocorre maior indução do anticorpo nesses casos.

Ao contrário dos estudos anteriores, nos quais não foi vista diferença de idade, foi encontrada tendência a diferença significativa na média de idade dos pacientes com e sem o anticorpo. A amostra deste estudo possui média de idade maior do que os outros estudos, o que pode ser a causa desse achado, considerando a maior tendência a presença de autoanticorpos nas pessoas idosas (VADASZ et al., 2013).

Com relação aos títulos de anti-RR encontrados nesta amostra, verificaram-se títulos mais baixos do que a maioria dos estudos prévios, apesar da heterogeneidade presente nos mesmos. Estudo de Carcamo *et al.* encontrou títulos entre 1:50 e 1:819.200 em coorte de pacientes americanos e entre 1:200 e 1:819.200 em coorte de pacientes italianos, valores muito acima dos encontrados em outros estudos (CARCAMO et al., 2013).

Não houve grande variação dos títulos nas amostras antes e após 12 semanas de tratamento entre os pacientes com títulos inicialmente positivos, assim como foi demonstrado por Calise *et al.* (CALISE et al., 2016). Como a inibição do IMPDH2 pela RBV ocorre de forma irreversível, supõe-se que os títulos permaneçam independente do status do HCV e do uso da droga, com possível flutuação ao longo do tempo.

No presente estudo, não se encontrou associação entre recidiva em tratamento prévio e maior frequência de anti-RR, apesar de que 50% dos portadores do anticorpo na amostra pré-tratamento haviam recidivado em algum dos tratamentos realizados. Em alguns estudos com PEG e RBV, o anticorpo foi mais relacionado a recidivantes que não respondedores e respondedores (CALISE et al., 2016; CARCAMO et al., 2013; COVINI et al., 2012; NOVEMBRINO et al., 2014). Os não respondedores geralmente interrompem o tratamento assim que é verificada a falta de resposta, não recebendo a medicação pelo tempo total. Porém os respondedores e recidivantes recebem a medicação pelo mesmo período de tempo, o que não explica porque o

anticorpo estaria mais presente em recidivantes, exceto por algum possível efeito na resposta ao tratamento.

O HCV RNA da 12<sup>a</sup> semana após o fim do tratamento, que serve como indicador de resposta virológica sustentada, foi solicitado a todos os pacientes. As taxas de cura do HCV com os novos DAAs pode ultrapassar 90%(SPENGLER, 2017). O exame foi realizado por 62 dos 70 pacientes, com confirmação da cura em 59 deles. Dois dos três pacientes que não responderam ao tratamento não apresentaram anti-RR positivo nem antes nem após o tratamento. Atrasos no início da medicação e dificuldades para realizar o exame nos pacientes do interior do estado são as prováveis causas de não termos conseguido resultados de HCV RNA de todos os pacientes. Dentre os pacientes com anticorpo positivo, todos foram considerados curados, exceto por uma, a paciente ALJ, cujo anti-RR surgiu após as 12 semanas de uso dos DAAs. Os outros dois pacientes com surgimento do anti-RR após uso dos DAAs responderam ao tratamento. Esses dados sugerem que neste tratamento o anticorpo não parece ter influência na resposta.

Pela maior frequência do anticorpo nos pacientes com hepatite C, especula-se que o simples fato da indução dos RR *in vitro* pela RBV não seja condição suficiente para esse fato. Características específicas nos pacientes com HCV parecem ser importantes. A estabilidade maior dos RR induzidos pela RBV (por ser um inibidor irreversível da IMPDH2), associada aos efeitos do PEG, o estado pró-inflamatório do fígado infectado pelo HCV e as alterações imunológicas induzidas pelo mesmo parecem ser o conjunto responsável pelo surgimento dos anti-RR (KEPPEKE et al., 2016a).

Esse estudo apresentou limitações principalmente devido ao desenho do mesmo. Por se tratar de estudo longitudinal de seguimento, houve perdas de acompanhamento que impossibilitaram a coleta do soro após 12 semanas de uso dos DAAs em todos os pacientes. Além disso, o uso das medicações por 12 semanas pode não ser suficiente para induzir surgimento do anti-RR, que geralmente aparece no 6<sup>o</sup> mês do tratamento.

## 5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, observou-se a presença do anti-RR antes do uso dos novos DAAs em quase metade dos pacientes que tinham tratamento prévio contra o HCV. Após as 12 semanas de uso dos novos antivirais, esse anticorpo tornou-se positivo em 5,7% dos pacientes. Os dados biológicos não tiveram relação com o surgimento do anticorpo, porém a realização de terapia prévia contra a hepatite C e o tempo de uso de RBV nessa terapia prévia estiveram fortemente relacionados. Verificou-se ainda que o anti-RR pode surgir (ou ressurgir) após tratamento com os novos DAAs, numa frequência menor do que com o uso de IFN- $\alpha$  e ribavirina, talvez pela menor duração do tratamento dos esquemas terapêuticos atuais.

Futuros estudos serão necessários avaliando maior número de pacientes, principalmente aqueles que usarem 24 semanas de DAAs, com e sem a associação da ribavirina.

## REFERÊNCIAS

AFSHARZADEH, F. et al. The Presence of Autoantibodies to Cytoplasmic Rod and Ring Particles in the Serum of Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection.

**Hepatitis monthly**, v. 16, n. 12, p. 1–7, 2016.

BACON, B.R. et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 13, p. 1207–1217, 2011.

BAYRAKTAR, Y. et al. A comparison of the prevalence of autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: the role of interferon in the development of autoimmune diseases.

**Hepatogastroenterology**, v. 44, n. 14, p. 417–25, 1997.

BRASIL. Ministério da saúde. **Boletim epidemiológico: Hepatites Virais.**, v. 15, n. Hepatite C, p. 62, 2015a. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/es/node/90>>.

Acesso em: 19 set. 2016

BRASIL. Ministério da saúde. **Protocolo Clínico e Diretriz de Tratamento para Hepatite C.** Brasília, 2015b. Disponível em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo\\_clinico\\_diretrizes\\_hepatite\\_co\\_coinfeccoes.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_hepatite_co_coinfeccoes.pdf)>. Acesso em: 17 mai. 2016

BRASIL. Ministério da saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções.** Brasília, 2018. Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfeccoes>>. Acesso em: 06 abr. 2018

CALISE, S. J. et al. Glutamine deprivation initiates reversible assembly of mammalian rods and rings. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 15, p. 2963–2973, 2014.

CALISE, S. J. et al. “Rod and ring” formation from IMP dehydrogenase is regulated through the one-carbon metabolic pathway. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 15,

p. 3042–3052, 2016a.

CALISE, S. J. et al. Anti-rods/rings autoantibody seropositivity does not affect response to telaprevir treatment for chronic hepatitis C infection. **Autoimmunity Highlights**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2016b.

CALISE, S. J. et al. Reference standards for the detection of anti-mitochondrial and anti-rods/rings autoantibodies. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 2018

CARCAMO, W. C. et al. Induction of cytoplasmic rods and rings structures by inhibition of the CTP and GTP synthetic pathway in mammalian cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

CARCAMO, W. C. et al. Differential reactivity to IMPDH2 by anti-rods/rings autoantibodies and unresponsiveness to pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy in US and Italian HCV patients. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 2, p. 420–426, 2013.

CARCAMO, W. C. et al. Molecular cell biology and immunobiology of mammalian rod/ring structures. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 308, p. 35–74, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Hepatitis C FAQs for Health Professionals**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#a10>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

CHAN, E. K. L. et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns (ICAP) 2014-2015. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUL, 2015.

CHEN, C.-H. et al. Prevalence and clinical relevance of serum autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, p. A198–A198, 2009.

CHOI, K. H. et al. Anti-rods and rings autoantibodies in a patient with hepatitis C virus infection. **Annals of Laboratory Medicine**, 2015.

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

CLIMENT, J. et al. Clinical correlates of the “rods and rings” antinuclear antibody pattern. **Autoimmunity**, v. 49, n. 2, p. 102-8, 2016

COCQUEREL, L. et al. CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10677–83, 2003.

COVINI, G. et al. Cytoplasmic rods and rings autoantibodies developed during pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. **Antiviral Therapy**, v. 17, n. 5, p. 805–811, 2012.

CZAJA, A. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. **Journal of hepatology**. v. 30, p. 394-401

DAMMERMANN, W. et al. Autoantibodies against “rods and rings”-related IMPDH2 in hepatitis C genotype 1 and DAA therapy in a “real life” cohort. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 206, n. 5, p. 379–382, 2017.

DELLAVANCE, A. et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN): recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 89–98, 2009.

DELLAVANCE, A.; ANDRADE, L.E.C. Das células LE às células HEp-2: perspectiva histórica e avaliação crítica do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinúcleo. **Sinopse de Reumatologia, UNIFESP**, n. 3, p. 7–21, 2006.

Disponível em:

<[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=3500](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3500)> Acesso em: 16 out. 2017

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL

Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2014. **Journal of Hepatology**, v. 63, p. 199–236, 2014.

FARIA, A.C.; BARCELLOS, K.S.A.; ANDRADE, L.E.C.; Longitudinal fluctuations of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. **Journal of rheumatology**, v. 32, n. 7, p. 1267-72, 2005

FRANCESCANTONIO, Paulo Luiz Carvalho et al . IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo , v. 54, n. 1, p. 44-50, Feb. 2014 .

GOU, K. M. et al. CTP synthase forms cytophidia in the cytoplasm and nucleus. **Experimental Cell Research**, v. 323, n. 1, p. 242–253, 2014.

IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 44, p. 7896–7909, 2013.

JACOBSON, I. M. et al. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 25, p. 2405–2416, 2011.

JI, Y. et al. Regulation of the interaction of inosine monophosphate dehydrogenase with mycophenolic acid by GTP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 206–212, 2006.

KEPPEKE, G. D. et al. Longitudinal Study of a Human Drug-Induced Model of Autoantibody to Cytoplasmic Rods/Rings following HCV Therapy with Ribavirin and Interferon- $\alpha$ . **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

KEPPEKE, G. D. et al. Temporal evolution of human autoantibody response to cytoplasmic rods and rings structure during anti-HCV therapy with ribavirin and interferon- $\alpha$ . **Immunologic Research**, v. 60, n. 1, p. 38–49, 2014.

KEPPEKE, G. D. et al. Differential capacity of therapeutic drugs to induce Rods/Rings structures in vitro and in vivo and generation of anti-Rods/Rings autoantibodies. **Clinical Immunology**, v. 173, p. 149–156, 2016a.

KEPPEKE, G. D. et al. Anti-rods/rings autoantibody generation in hepatitis C patients during interferon- $\alpha$ /ribavirin therapy. **World Journal of Gastroenterology**, 14 fev. 2016b.

LOPES, E. P. et al. Autoantibodies before, during and after administration of recombinant interferon-a for chronic viral hepatitis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 455–60, 1995.

MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.

NOVEMBRINO, C. Prevalence of “Rings Rods” autoantibodies on Hep-2 preparations. **Biochimica Clinica**, v. 37, p. M035, 2013.

NOVEMBRINO, C. et al. Interferon-ribavirin therapy induces serum antibodies determining “rods and rings” pattern in hepatitis C patients. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21, n. 12, p. 944–949, 2014.

PENG, Y. et al. Expression and clinical significance of antinuclear antibody in hepatitis C virus infection. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 33, n. 5, p. 402–6, 2001.

PROBST, C. et al. Development of a recombinant cell-based indirect immunofluorescence assay ( RC-IFA ) for the determination of autoantibodies against “ rings and rods ” -associated inosine-5' -monophosphate dehydrogenase 2 in viral hepatitis C. **Clinica Chimica Acta**, v. 418, p. 91–96, 2013.

SEELIG, H. P. et al. Autoantibodies against inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 - Characteristics and prevalence in patients with HCV-infection.

**Clinical Laboratory**, v. 57, n. 9–10, p. 753–765, 2011.

SHAIKH, Y.; KRANTZ, A.; EL-FARRA, Y. Anti-rods and rings autoantibodies can occur in the hepatitis C-naïve population. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 3, p. 175–180, 2013.

SPENGLER, U. Direct antiviral agents (DAAs) - a new age in the treatment of hepatitis C virus infection. **Pharmacology & Therapeutics**, 2017.

STINTON, L. M. et al. Clinical associations and potential novel antigenic targets of autoantibodies directed against rods and rings in chronic hepatitis C infection. **BMC gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 50, 2013.

STRADER, D. B.; SEEFF, L. B. A brief history of the treatment of viral hepatitis C. **Clinical Liver Disease**, v. 1, n. 1, p. 6–11, 2012.

WILLIAMS, M. J. et al. Autoantibodies in chronic hepatitis C virus infection and their association with disease profile. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 5, p. 325–331, 2009.

WILLINGHAM, M.C; RICHERT, A. V. R. Fibrillar Structure in Cultured Cells Detected Monoclonal Antibody Keratin-like. **Experimental Cell Research**, v. 171, p. 284–295, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global hepatitis report, 2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>>. Acesso em: 08 jan. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis C. Fact sheet no. 164**, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 16 out. 2017

VADASZ, Z. et al. Age-related autoimmunity. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013

YEE, L. J. et al. Antinuclear antibodies (ANA) in chronic hepatitis C virus infection: Correlates of positivity and clinical relevance. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 11, n. 5, p. 459–464, 2004.

## APÊNDICE A

### FICHA DE COLETA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - HOSPITAL DAS CLÍNICAS

NOME: \_\_\_\_\_ PRONTUÁRIO: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_  
 GENÓTIPO: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_ CARGA VIRAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_  
 TRATAMENTO PRÉVIO? ( ) SIM ( ) NÃO  
 QUAL? \_\_\_\_\_ ANO? \_\_\_\_\_ TEMPO DE TTO: \_\_\_\_\_  
 RESPOSTA: ( ) PARCIAL ( ) NULO ( ) RECIDIVANTE  
 QUAL? \_\_\_\_\_ ANO? \_\_\_\_\_ TEMPO DE TTO: \_\_\_\_\_  
 RESPOSTA: ( ) PARCIAL ( ) NULO ( ) RECIDIVANTE  
 QUAL? \_\_\_\_\_ ANO? \_\_\_\_\_ TEMPO DE TTO: \_\_\_\_\_  
 RESPOSTA: ( ) PARCIAL ( ) NULO ( ) RECIDIVANTE

BIÓPSIA MAIS RECENTE: DATA: \_\_\_\_\_ FIBROSE: \_\_\_\_\_  
 FIBROSCAN/ARFI: DATA: \_\_\_\_\_ RESULTADO: \_\_\_\_\_  
 APRI E FIB-4: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_  
 COMORBIDADES: \_\_\_\_\_  
 MEDICAÇÕES EM USO: \_\_\_\_\_  
 CONDIÇÃO ESPECIAL? ( ) COINF. HIV ( ) TRANSPLANTADO ( ) MANIF EXTRA-  
 HEPÁTICA ( ) IRC

ESQUEMA ESCOLHIDO: \_\_\_\_\_ DURAÇÃO: \_\_\_\_\_  
 DATA DE INÍCIO: \_\_\_\_\_ DATA TÉRMINO: \_\_\_\_\_  
 COLETA INICIAL: ( / / ) \_\_\_\_\_ RESULTADO: \_\_\_\_\_  
 COLETA COM 12 SEMANAS: ( / / ) \_\_\_\_\_ RESULTADO: \_\_\_\_\_  
 HCV RNA 12ª SEMANA PÓS: ( / / ): \_\_\_\_\_

## **APÊNDICE B - ARTIGO ORIGINAL: LONG-TERM PERSISTENCE OF ANTI-RODS AND RINGS ANTIBODIES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C AFTER ANTIVIRAL TREATMENT**

**Ana Beatriz da Silva Sacerdote<sup>1</sup>, Norma Arteiro Filgueira<sup>2</sup>, Silvana de Barros Barreto<sup>3</sup>, Andréa Dória Batista<sup>2</sup>, Edmundo Pessoa Lopes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Recife, PE, Brasil;

Address: Universidade Federal de Pernambuco – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Serviço de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Recife, PE, Brasil;

Address: Hospital das Clínicas – Ambulatório de Gastroenterologia: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Análises Clínicas, Hospital das Clínicas, Recife, PE, Brasil.

Address: Hospital das Clínicas – Laboratório de Análises Clínicas: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

Corresponding Author: Ana Beatriz da Silva Sacerdote

Email: ana.sacerdote@icloud.com

Phone number: +55 81 994225100

ORCID: 0000-0001-5063-6064

### **Acknowledgments**

We thank the patients who participate in this study. We also appreciate the help of Caroline Louise Diniz Pereira with the collection of samples and Emídio Cavalcanti de Albuquerque with the statistical analysis. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSA dip - TESL (Cambridge University).

### **Compliance with Ethical Standards**

#### *Disclosures and Conflict of Interest*

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### *Funding*

This study was not specifically funded by any institution.

#### *Ethical approval:*

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

#### *Informed Consent:*

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## ABSTRACT

**Introduction:** Anti-rods and rings (anti-RR) antibodies are related to hepatitis C virus (HCV) in patients treated with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV). Only RBV induces rods/rings structures *in vitro*, but *in vivo*, the antibody appearance is related to the combination of these drugs, because data about patients using just one of these drugs alone is missing. Some studies suggest disappearance of these antibodies over time. The aim of this study was to describe the occurrence of anti-RR in patients with chronic hepatitis C treatment-naïve or previously PEG-IFN/RBV experienced, evaluating the persistence of anti-RR antibodies long after PEG-IFN /RBV treatment. **Methods:** From 2016 to 2017, 70 HCV-infected patients were screened for anti-RR using indirect immunofluorescence. Demographic, clinical and data about previous treatments against HCV were assessed. **Results:** Thirty-four patients (49%) had been previously treated with PEG-IFN /RBV and the average time since they had received the last antiviral treatment was 85.4 months. Anti-RR seropositivity was detected in 16 patients (23%), and all of these had used PEG-IFN /RBV (corresponding to 47% of experienced patients). Previous antiviral treatment and previous exposure time to RBV were associated with anti-RR positivity. Median time elapsed since last treatment was similar between anti-RR positive and anti-RR negative patients. **Conclusion:** Anti-RR seropositivity was not observed in treatment-naïve patients, but was detected in almost half of patients previously treated with PEG-IFN and RBV, even after a long period without exposure to these drugs. This antibody was related to extended prior exposure to ribavirin.

**Key-words:** Chronic hepatitis C. Autoantibodies. IMPDH enzyme. Ribavirin. Antiviral therapy.

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection causes high morbimortality, leading to liver cirrhosis in 4 to 20% of those infected [1]. In addition to liver disease, this virus has been associated with autoimmune phenomena and the production of autoantibodies

[2]. A positive ANA test has been reported in 7 to 65% of infected patients, the most common pattern being nuclear fine speckled [3,4]. It is believed that HCV promotes activation and proliferation of B-lymphocytes, stimulating the generation of these antibodies [5,6].

Recently, a novel cytoplasmic ANA pattern in indirect immunofluorescence described as anti-rods and rings (anti-RR) has been reported almost exclusively in hepatitis C patients treated with pegylated interferon (PEG-IFN) plus ribavirin (RBV). RBV is known to irreversibly inhibit inosine monophosphate dehydrogenase ~~type II~~ (IMPDH<sub>2</sub>), which is the main target of the anti-RR antibody [7]. However, data demonstrating that RBV alone is capable of inducing this antibody *in vivo* is rare. In addition, the literature available has not reported whether the immune effects induced by PEG-IFN are or are not fundamental to the emergence of these autoantibodies [7,8,9].

Furthermore, previous studies investigating anti-RR after the end of hepatitis C treatment have suggested its disappearance over the course of time in most cases [9, 10]. Little is known, however, about the persistence of anti-RRs for longer periods after antiviral therapy. Despite the arrival of the new antivirals replacing PEG-IFN and RBV in the treatment of hepatitis C, a large number of patients undergoing these new treatments received the previous combination therapy with PEG-IFN /RBV in the past, and many of them may still have anti-RR seropositivity. In addition, some studies have observed a relationship between the emergence anti-RR and virus relapse, thereby raising the suspicion of a negative impact of this antibody on the treatment outcome [7,9,11,12]. Therefore, this study aimed to describe the occurrence of anti-RR in patients with chronic hepatitis C treatment-naïve or previously PEG-IFN /RBV-experienced, evaluating the persistence of these antibodies long after antiviral treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Patient characteristics*

From 2016 to 2017, 70 patients were evaluated at the Hepatology outpatient clinic in the Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). They were all over 18 years old, with chronic hepatitis C confirmed by positive anti-

HCV antibodies and circulating HCV RNA for more than 6 months. Serum samples were collected for anti-RR research and clinical and demographic data, including information about previous treatments against HCV, were collected from interviews and medical records. All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the Institutional Research Committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. The institution's Ethics Committee approved the present study, and informed consent was obtained from all individual participants included.

#### *Anti-RR detection*

All serum samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and processed for an indirect Immunofluorescence (IIF) assay with HEp-2 slides from Euroimmun (Lubeck, Germany), at a screening dilution of 1/40. Following initial dilution with a phosphate buffered saline (PBS), the samples were incubated with HEp-2 cells for 30 minutes at room temperature. Next, after washing with PBS for 10 minutes, the cells were incubated with fluorescein-labeled anti-human IgG for another 30 minutes in the dark. After further washing, the slides were assembled with 10  $\mu\text{L}$  of Glycerol. Analyses were made using an Olympus BX 41 immunofluorescence microscope under 100x magnification. These were undertaken by an experienced observer who did not know the patient's clinical status.

All patients considered to have the anti-RR antibody presented the ANA rods and rings pattern, designated AC-23 by the International Consensus of ANA Patterns (15) with a titer greater than or equal to 1/40. Positive samples were then titrated and analyzed again.

#### *Statistical Analysis*

The data were analyzed using STATA/ SE 12.0 and Excel 2010. All tests were applied with 95% confidence. Chi-square test and Fisher's exact test were used in the descriptive analysis and to check if there were an association between the categorical variables. The Kolmogorov-Smirnov Normality Test was used for quantitative variables ( $n \geq 30$ ). Comparisons between groups were performed using Student's *t*-test and Mann-Whitney test depending on data distribution.

## RESULTS

### *Study population*

During the study period, 70 patients were evaluated. Their mean age was 60.9  $\pm$  10.9 years. Genotype 1 was the most prevalent, present in 50 patients (71.4%). Five patients (7.1%) were HIV co-infected and one patient had diagnosed systemic lupus erythematosus. One patient was using azathioprine and another one mycophenolate mofetil.

Concerning previous treatments against HCV, 36 (51.4%) were treatment-naïve, and 34 of the 70 patients (48.6%) had already used a therapeutic regimen, six of them having undergone two attempts and four of them three attempts. The combination of PEG-IFN /RBV was the most used regimen, having been received by 31 of the 34 experienced patients. Four of the 70 patients (5.8%) received a regimen with telaprevir. Relapse after a previous treatment was observed in 13 (38%) patients and 21 (62%) of the 34 patients do not respond to previous antiviral therapy. Demographic, clinical, virological, and previous treatment data of the 70 patients are described in Table 1.

**Table 1** - Demographic, clinical and virological data of the 70 patients with chronic hepatitis C.

<b>Characteristics</b>	<b>n=70 (%)</b>
<b>Demographic</b>	
Age (mean $\pm$ SD)	60.9 $\pm$ 10.9
Males	37 (52.9)
<b>Clinical</b>	
Cirrhosis	22 (31.4)
Diabetes Mellitus 2	19 (27.1)
Hepatosplenic schistosomiasis	14 (20.0)
Co-infection HIV-HCV	5 (7.1)
Tenofovir or Lamivudine use	5 (7.1)
<b>HCV characteristics</b>	
Genotype 1	50 (71.4)

Genotypes 2 and 3	20 (28.6)
HCV RNA > 400.000 UI/ml	46 (65.7)

Values presented as *n* (%) unless otherwise indicated. Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus;

The mean time since the last treatment was  $85.4 \pm 57.5$  months, ranging from 10 to 225 months. The mean total length of time that each patient had used antiviral medications was  $16.3 \pm 19$  months, ranging from one to 107 months, with the mean time of ribavirin use being  $15.7 \pm 18.9$  months, ranging from one to 107 months. Previous treatment data of the 70 patients are described in Table 2.

**Table 2** - Previous treatment data of the 70 patients with chronic hepatitis C.

<b>Treatment Characteristics</b>	<b>n=70 (%)</b>
<b>Previous Treatment of HCV</b>	
Treatment-naïve	36 (51.4)
Previously treated	34 (48.6)
Treated with PEG-IFN + RBV	31 (44.2)
Previous relapse	13 (18.6)
Treated more than once	10 (14.3)
Use of Telaprevir	4 (5.8)
Number of months since the last treatment (mean +SD)	$85.4 \pm 57.5$
Period (in months) of previous treatments (mean +SD)	$16.3 \pm 19$
Period (in months) of RBV use (mean +SD)	$15.7 \pm 18.9$
Period (in months) of IFN use (mean +SD)	$11.6 \pm 7.9$

Values presented as *n* (%) unless otherwise indicated. Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; RBV, Ribavirin; IFN: alpha-interferon; PEG-IFN, pegylated interferon;

#### *Anti-rods and rings seropositivity*

Anti-RR reactivity was detected in the sera of 16 of the 70 patients studied (22.8%), and all of them (47% of the 34 experienced patients) had been previously treated.

The mean age among the individuals with a positive antibody was higher than among those with a negative antibody (65.4 years vs 59.6 years;  $p = 0.064$ ). There

was no significant relationship between sex, genotype, viral load, diagnosis of cirrhosis, HIV co-infection, schistosomiasis or diabetes with the seropositivity of the antibody. None of the HIV co-infected patients were positive. Patient with systemic lupus erythematosus and patients in use of azathioprine and mycophenolate mofetil did not show antibody positivity. Table 3 presents clinical characteristics of the 70 patients according to anti-RR positivity.

**Table 3** - Clinical characteristics of the 70 patients with chronic hepatitis C according to the positivity of the anti-rods and rings.

Characteristic	Anti-RR		p
	Positive	Negative	
N	16	54	
Male	8 (50)	29 (53.7)	0.794 <sup>1</sup>
Age (mean $\pm$ SD)	65.4 $\pm$ 10.5	59.6 $\pm$ 10.8	0.064 <sup>3</sup>
Genotype 1	12 (75)	38 (70.4)	1.000 <sup>2</sup>
HCVRNA > 400.000UI	10 (62.5)	36 (66.6)	1.000 <sup>1</sup>
Cirrhosis	6 (37.5)	16 (29.6)	0.615 <sup>1</sup>
DM2	5 (31.2)	14 (25.9)	0.757 <sup>2</sup>
HSS	3 (18.7)	11 (20.3)	1.000 <sup>2</sup>
HIV	0	5 ( 9.2)	0.582 <sup>2</sup>

Values presented as *n* (%) unless otherwise indicated. 1: Chi-square test; 2: Fisher's exact test; 3: Student's t-test; Abbreviations: Anti-RR: Anti-rods and rings; HIV: Human Immunodeficiency Virus; DM2, Diabetes Mellitus type 2; HSS: Hepatosplenic schistosomiasis

Previous treatment against HCV infection showed a strong association with the presence of the anti-RR antibody. Among the 16 anti-RR positive patients, all had received at least one previous therapeutic regimen against HCV ( $p = 0.000$ ), four of them (25%) having received it twice and two of them (12.5%) three times. But even though six of the 10 patients (60%) who received more than one regimen presented

positive anti-RR, comparing patients with single treatment versus multiple treatments did not show differences in the presence of the antibody (62,5% vs 37,5%,  $p = 0,329$ ). Eight anti-RR carriers (50%) had relapsed in one of these treatments ( $p = 0.213$ ) and the other eight were non-responders.

Three of the 16 anti-RR positive patients (18.8%) had received telaprevir previously, whereas only one of the 54 negative ones (1.9%) received it ( $p = 0.035$ ), but when comparing the appearance of the antibody between patients with PEG-IFN / RBV and PEG-IFN / RBV and telaprevir, no relationship was found between telaprevir use and anti-RR positivity. There was no relationship between mean duration of previous treatment (22.2 months vs 10.9 months;  $p = 0.100$ ) or mean duration of IFN use (12.4 months vs 10.9 months;  $p = 0.603$ ) according to the occurrence of anti-RR. The median time of previous use of ribavirin was 14.5 months between the positive ones and 9 months among the negatives ( $p = 0.04$ ). The mean time elapsed since the last treatment was long but similar in both anti-RR positive and negative patients (82 months vs 88.3 months;  $p = 0.756$ ). Table 4 presents the characteristics of previous treatments of the 70 patients, according to anti-RR positivity.

**Table 4** - Characteristics of the previous treatments of 70 chronic hepatitis C patients according to the positivity of anti-rods and rings

Characteristics	Anti-RR		p
	Positive	Negative	
<b>N</b>	16	54	
<b>Previous treatment</b>	16 (100)	18 (33.3)	<b>0.000<sup>1</sup></b>
<b>Relapse</b>	8 (50)	5 (9.4)	0.213 <sup>1</sup>
<b>Telaprevir used</b>	3 (18.7)	1 (1.9)	<b>0.035<sup>2</sup></b>
<b>Number of months since the last treatment (mean +SD)</b>	82	88.3	0.756 <sup>3</sup>
<b>Period (in months) of previous treatments (mean +SD)</b>	22.2	10.9	0.100 <sup>3</sup>
<b>Period (in months) of IFN use (mean +SD)</b>	12.47	10.9	0.603 <sup>3</sup>

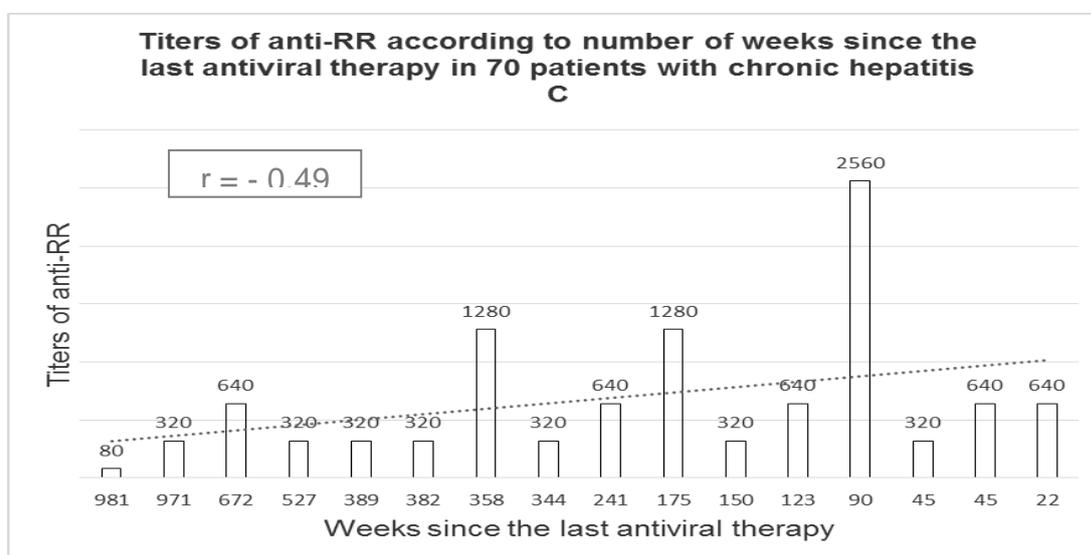
**Period (in months) of RBV use (median)** 14.5 9.00 **0.04<sup>4</sup>**

Values presented as *n* (%) unless otherwise indicated. 1: Chi-square test; 2: Fisher's exact test; 3: Student's t-test; 4: Mann-Whitney test; Abbreviations: IFN- $\alpha$ , alpha- Interferon; RBV, Ribavirin;

### *Anti-RR titers*

The titers of anti-RR reactivity for all anti-RR positive patients varied from 1/80 to 1/2560. Seven of the 16 patients (43.7%) had an antibody titer of 1/320. The highest titer was 1/2560 in only one patient.

Anti-RR titers were lower in those who had been treated a long time before, suggesting the reduction of titers in accordance with time progression after therapy ( $r = -0.49$ ). Figure 1 shows an inverse correlation between time elapsed since last treatment and anti-RR titers. Moreover, the mean titer of the 8 patients who had been treated the longest time before was  $1/450 \pm 368$  and the mean titer of those 8 treated more recently was  $1/880 \pm 741$  ( $p = 0.163$ ).



**Fig 1** – Titers of anti-RR according to number of weeks since the last antiviral treatment in 70 patients with chronic hepatitis C.

## **DISCUSSION**

In the current study, 16 of the 70 (22.8%) patients evaluated presented anti-RR reactivity even after a long period without receiving antiviral therapy. We did not find anti-RR occurrence in the 36 treatment-naïve patients with chronic C hepatitis.

The presence of anti-RR seropositivity was related to previous therapy since this antibody was detected in almost half of patients previously treated. According to the literature, among the HCV-infected population who receive IFN/RBV, anti-RR is found in approximately 25% of cases [9,10,12,16]. A study from Keppeke et al. suggests that anti-RR reactivity appears in approximately 40% of patients treated once with IFN/RBV, and in 70% of those treated two or three times [18]. The data from our study showed 41.6% of anti-RR seropositivity in those treated once, and 60% in those treated more than one time.

However, a population-based study found the presence of anti-RR reactivity in 39 of the 4.738 subjects analyzed (0.74%), of whom only one presented hepatitis C, indicating that this antibody can occur in healthy individuals [17].

In our study, the mean time since the patients received their last treatment against HCV was long, 85.4 months. Nevertheless, despite this long period, previously treated patients had a high occurrence of anti-RR reactivity. On the other hand, some authors have suggested the disappearance of this antibody over a few months. In fact, Keppeke et al. revealed anti-RR disappearance in half of their patients after 6 months of the end of treatment [10]. Novembrino et al. also reported the loss of this antibody in 80% of their patients after one year [9]. However, in the literature reviewed, no published study was found that evaluated the presence of this antibody in patients such a long time after previous treatment as we did in our study.

It is known that the immune response that leads to the emergence of anti-RR is similar to that occurring after an infection, but slower, starting months after the antigenic stimulation [19]. In cases of immune response to infection or other external antigens, after the end of the antigenic stimulus, long-lived plasma cells maintain low IgG plasma levels specific for that antigen, causing continuous antibody production. However, in the case of autoimmune diseases, it has already been shown that there may be fluctuations in the levels of autoantibodies detected by IIF or other methods, independent of treatment or disease activity [20,21]. It has not been established whether this occurs because it is part of the natural history of these autoimmune diseases or because of limitations in those methods of antibody detection.

We believe that the detection of this high frequency of anti-RR reactivity after so many years without its stimulus (PEG-IFN /RBV) occurred possibly due to the persistence of antibody production by long-lived plasma cells. It is important to highlight that in our study 37.5% of the subjects received more than one treatment, whereas the patients studied by Keppeke and Novembrino had been treated only once. However, we could not demonstrate that the presence of multiple treatments was significant for the presence of anti-RRs.

Although we found the presence of anti-RR seropositivity a long time after treatment, the patients who received antiviral treatment a long time ago had lower titers than those who receive it in the recent past. The median titers of the eight patients who undergone treatment for a longer period was half of the median titer of those treated more recently. In addition, there was a trend to an inverse correlation between the time elapsed since last treatment and anti-RR titers.

Despite the absence of statistical significance, the mean duration of previous treatment in those with positive anti-RR was twice as long as the duration for those with a negative antibody. The highest frequency of the antibody in the patients whose treatments lasted longer has been described in previous studies [9,10].

Regarding the duration of previous RBV use, there was a positive association between longer exposure to this drug (and consequently higher cumulative dose) and the presence of anti-RR. Indeed, Novembrino et al. had already described a positive relationship between the RBV dosing and the occurrence of anti-RR reactivity (1,000 mg in the positive vs 800 mg in the negative cases,  $p = 0.04$ ), but this effect was excluded by multivariate logistic regression [9]. Information about the relationship between the emergence of anti-RR and the duration of RBV use is limited. No relationship was observed between the previous duration of alpha-interferon (PEG-IFN or conventional) use and the occurrence of antibodies.

Interestingly, we observed a higher frequency of anti-RR positivity in patients who previously received telaprevir. However, the three patients receiving telaprevir had a mean duration of previous treatment and RBV use of 17.3 months, both superior to the negative patients, and this may be the factor associated with antibody positivity. However, Calise et al. evaluated 52 patients treated with PEG-IFN /RBV plus telaprevir and found an anti-RR occurrence of 19%. Dammermann et al. evaluated 37 patients receiving PEG-IFN /RBV plus boceprevir and 67 patients receiving PEG -IFN /RBV plus telaprevir, with an anti-RR positivity of 46% and 32%, respectively. These studies

concluded that boceprevir and telaprevir had no influence on the emergence of anti-RRs [12,16].

In our study, no association was observed between the presence of anti-RR reactivity and demographic parameters such as gender, viral load or genotype, as already mentioned in published studies [9-11]. The data of the present study revealed no relationship between anti-RR and the presence of hepatosplenic schistosomiasis, HIV co-infection or the presence of diabetes mellitus. Although some of these factors are capable of inducing immunosuppression, there was apparently no greater induction of the antibody in these cases.

Contrary to previous studies, in which no difference in age was observed, we found a trend towards older age in patients positive for anti-RR. This finding is attributable to the older age of the population in our study in comparison with subjects in other anti-RR studies, given a greater tendency for autoantibodies in the elderly [22].

Considering the titers of anti-RR, this study found lower titers than most previous studies, despite the heterogeneity of the data [9,19]. Carcamo et al. in 2013 found titers between 1/50 and 1/819.200, which are values far above those found in other studies [11]. In effect, the anti-RR titers in our patients were lower because they arose a long time ago, during a previous treatment, and had decreased over time, as was shown in Figure 1.

In our study, there was no association between relapse in previous treatment and the frequency of anti-RR reactivity, although almost 50% of the patients had relapsed in at least one of their prior antiviral schemes. In some studies with IFN/RBV use, the anti-RR has been more related to relapsers than to non-responders and responders [7,9,11,12]. Non-responders usually interrupt the therapeutic regimen as soon as the lack of response is verified, not taking their medication for the total length of time recommended. However, sustained responders and relapsers received the medication for the same period, which does not explain why the antibody would be more present in relapsers, except for some possible immunological effect on treatment outcomes.

The present study has limitations, mainly due to its design. Because it was a retrospective analysis, the number of the patients was limited and we do not know the exact time of the appearance of anti-RR and their titers when they appeared in patients previously treated.

Further and prospective studies will be necessary to evaluate the impact of the anti-RR emergence in virological responses during HCV therapy using the new direct-acting antivirals associated with RBV.

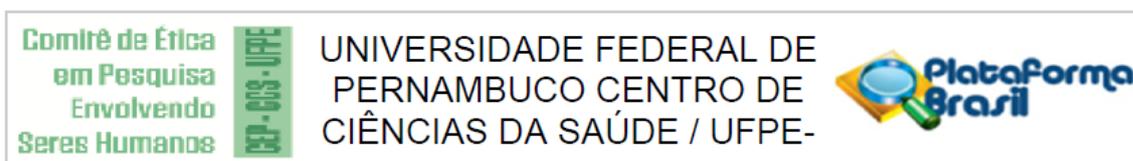
In conclusion, in the present study anti-RR was not observed in treatment-naïve patients but was detected in almost half of patients who had been previously treated with PEG-IFN /RBV, even after a long period without antiviral using. Time of RBV use in this previous therapy was related to the occurrence of this antibody, and the anti-RR persisted after periods as long as 225 months without contact with antiviral agents against hepatitis C.

## References

1. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014;61(1):S58–68.
2. Stroffolini T, Colloredo G, Gaeta GB. Does an “autoimmune” profile affect the clinical profile of chronic hepatitis C? An Italian multicentre survey. *J Viral Hepat* 2004;11(3):257–62.
3. Yee LJ, Kelleher P, Goldin RD, Marshall S, Thomas HC, Alberti A, et al. Antinuclear antibodies (ANA) in chronic hepatitis C virus infection: Correlates of positivity and clinical relevance. *J Viral Hepat*. 2004;11(5):459–64.
4. Peng Y, Hsieh S, Yang D, Tung C, Hu W, Huang W. Expression and clinical significance of antinuclear antibody in hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol*. 2001;33(5):402–6.
5. Williams MJ, Lawson A, Neal KR, Ryder SD, Irving WL. Autoantibodies in chronic hepatitis C virus infection and their association with disease profile. *J Viral Hepat*. 2009;16(5):325–31.
6. Cocquerel L, Kuo C-C, Dubuisson J, Levy S. CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol*. 2003;77(19):10677–83.
7. Covini G, Carcamo WC, Bredi E, Von Mühlen CA, Colombo M, Chan EKL. Cytoplasmic rods and rings autoantibodies developed during pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther*. 2012;17(5):805–11.
8. Lopes EP, Silva AE, Sette Júnior H, Guimarães RX, Ferraz ML. Autoantibodies before, during and after administration of recombinant interferon- $\alpha$  for chronic viral hepatitis. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 1995;37(5):455–60.
9. Novembrino C, Aghemo A, Ferraris Fusarini C, Maiavacca R, Matinato C, Lunghi G, et

- al. Interferon-ribavirin therapy induces serum antibodies determining “rods and rings” pattern in hepatitis C patients. *J Viral Hepat.* 2014;21(12):944–9.
10. Keppeke GD, Nunes E, Ferraz MLG, Silva EAB, Granato C, Chan EKL, et al. Longitudinal Study of a Human Drug-Induced Model of Autoantibody to Cytoplasmic Rods/Rings following HCV Therapy with Ribavirin and Interferon- $\alpha$ . *PLoS One.* 2012;7(9).
  11. Carcamo WC, Ceribelli A, Calise SJ, Krueger C, Liu C, Daves M, et al. Differential reactivity to IMPDH2 by anti-rods/rings autoantibodies and unresponsiveness to pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy in US and Italian HCV patients. *J Clin Immunol.* 2013;33(2):420–6.
  12. Calise SJ, Bizzaro N, Nguyen T, Bassetti D, Porcelli B, Almi P, et al. Anti-rods/rings autoantibody seropositivity does not affect response to telaprevir treatment for chronic hepatitis C infection. *Autoimmun Highlights.* 2016;7(1):1–6.
  13. European Association for Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *J Hepatol* 2015;63:199–236.
  14. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretriz de Tratamento para Hepatite C [Internet]. Brasília (BR); 2015 [cited 2018 Apr 12]. 102 p. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo\\_clinico\\_diretrizes\\_hepatite\\_co\\_coifecoes.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_hepatite_co_coifecoes.pdf)
  15. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns (ICAP) 2014-2015. *Front Immunol.* 2015;6.
  16. Dammermann W, Polywka S, Dettmann I, Mindorf S, Komorowski L, Wehmeyer M, et al. Autoantibodies against “rods and rings”-related IMPDH2 in hepatitis C genotype 1 and DAA therapy in a “real life” cohort. *Med Microbiol Immunol.* 2017;206(5):379–82.
  17. Shaikh Y, Krantz A, El-Farra Y. Anti-rods and rings autoantibodies can occur in the hepatitis C-naïve population. *J Prev Med Hyg.* 2013;54(3):175–80.
  18. Keppeke GD, John Calise S, Chan EK, Andrade LEC. Anti-rods/rings autoantibody generation in hepatitis C patients during interferon- $\alpha$ /ribavirin therapy. *World J Gastroenterol.* 2016;22(6):1966-1974
  19. Keppeke GD, Satoh M, Ferraz MLG, Chan EKL, Andrade LEC. Temporal evolution of human autoantibody response to cytoplasmic rods and rings structure during anti-HCV therapy with ribavirin and interferon- $\alpha$ . *Immunol Res.* 2014;60(1):38–49.
  20. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;30(3):394–401.
  21. Faria AC, Barcellos KSA, Andrade LEC. Longitudinal fluctuation of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2005;32(7):1267–72.
  22. Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. Age-related autoimmunity. *BMC Med.* 2013;11(1):1.

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da presença e relevância clínica dos autoanticorpos tipo Rods and Rings durante o tratamento do vírus C com os antivirais de ação direta, com e sem ribavirina

**Pesquisador:** Ana Beatriz da Silva Sacerdote

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58349916.1.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.746.618

#### **Apresentação do Projeto:**

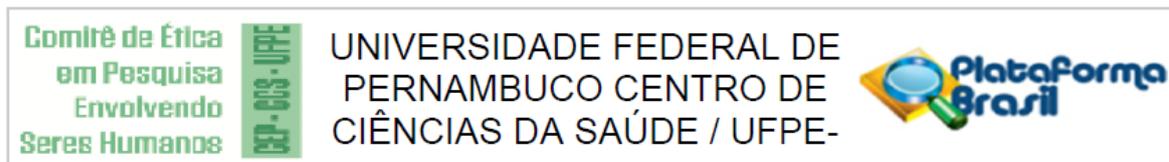
Trata-se de um projeto de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, pela aluna Ana Beatriz da Silva Sacerdote, sob a orientação dos professores Edmundo Pessoa Lopes e Norma Arteiro Filgueira.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo geral: Observar a prevalência e relevância clínica do anticorpo Rods and Rings em pacientes previamente tratados com Interferon peguilado e Ribavirina, e a incidência destes anticorpos após tratamentos com e sem Ribavirina.

Objetivos específicos:

- 1- Observar a prevalência do RR em relação ao tempo transcorrido desde o tratamento com PEG IFN/RIBA e aos desfechos clínicos.
- 2- Observar a frequência de surgimento dos RR entre os pacientes com esquemas terapêuticos com e sem Ribavirina.
- 3- Correlacionar o surgimento destes anticorpos com a resposta clínica nos pacientes que realizarão os tratamentos com os novos antivirais.



Continuação do Parecer: 1.746.618

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Risco de constrangimento com relação às informações colhidas, porém os pesquisadores se comprometem com o sigilo. Há a referência do risco de dor ou desconforto durante a coleta de sangue, porém os pesquisadores referem que a coleta será realizada por profissionais experientes para minimizar este risco. Benefícios: A pesquisa dos anticorpos RR poderá guiar melhor o tratamento de resgate, caso o mesmo seja necessário. Uma vez que será possível observar a resposta clínica concomitantemente com a presença ou não dos referidos anticorpos, se houver pior resposta, a modificação do esquema será guiada para um esquema sem Ribavirina, buscando não perpetuar assim o surgimento do anticorpo e aumentando a chance de uma melhor resposta clínica. Além disso, os conhecimentos adquiridos com os resultados do estudo poderão beneficiar os demais pacientes e a comunidade científica, contribuindo para um melhor entendimento e tratamento desse vírus que causa grande impacto econômico e social em todo o mundo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

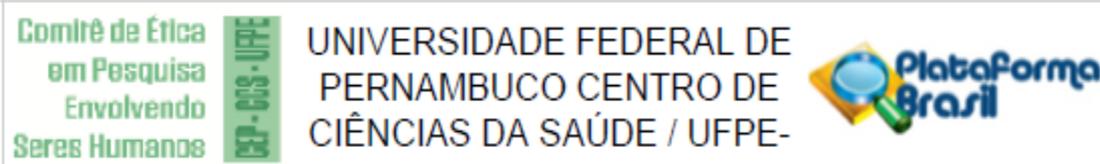
A importância desse estudo encontra-se no fato de que a elucidação da relevância clínica e comportamento dos anticorpos RR poderá trazer uma maior compreensão sobre a hepatite C e seu tratamento. A possível relação desses anticorpos com uma pior resposta clínica poderá definir melhor quais pacientes deverão ser submetidos a tratamentos com e sem Interferon ou Ribavirina, pois apesar do surgimento de novas drogas, as primeiras ainda são muito utilizadas em países em desenvolvimento devido ao seu custo acessível. Além disso, segundo os pesquisadores não há até o momento nenhum estudo com a pesquisa desse anticorpo nos pacientes submetidos aos novos antivirais.

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

Documentos apresentados devidamente datados, assinados e carimbados: 1 - Folha de rosto; 2- cartas de anuência do SAME/HC, do laboratório/HC, do ambulatório de hepatologia/HC; 3 - Autorização para uso de dados; 4 - termo de compromisso e confidencialidade; Os lattes dos pesquisadores foram anexados. O TCLE está adequado. Foram apresentados os projetos em ambos os formatos.

**Recomendações:**

Não há.



Continuação do Parecer: 1.746.618

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

Não há.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.