



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

IZOLDA MARIA FERNANDES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA ATRAVÉS DE MÉTODOS
NÃO-INVASIVOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA
PELO VÍRUS DA HEPATITE B**

Recife
2019

IZOLDA MARIA FERNANDES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA ATRAVÉS DE MÉTODOS
NÃO-INVASIVOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA
PELO VÍRUS DA HEPATITE B**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Área de concentração: Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Recife

2019

Catálogo na fonte
bibliotecária: Elaine Freitas CRB4:1790

- M292a Moura, Izolda Maria Fernandes de.
 Avaliação da fibrose hepática através de métodos não-invasivos em
 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B / Izolda Maria
 Fernandes de Moura. – 2019.
 140 f.: il.; 30 cm.
- Orientador: Edmundo Pessoa de Almeida Lopes.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
 Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina tropical.
 Recife, 2019.
- Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Técnicas de imagem por elasticidade. 2. Cirrose hepática. 3. Hepatite
 B crônica. 4. Curva ROC. I. Lopes, Edmundo Pessoa de Almeida
 (Orientador). II. Título.

616 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 162)

IZOLDA MARIA FERNANDES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA ATRAVÉS DE MÉTODOS
NÃO-INVASIVOS EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA
PELO VÍRUS DA HEPATITE B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 21/03/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Norma Arteiro Filgueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Andrea Dória Batista (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Paula Carolina Valença Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A meus pais, Glauco e Hilma, que sempre me apoiaram e dedicaram todo seu amor.

Aos meus irmãos, Katarina e Alexandre, pela compreensão com as ausências.

A meu esposo, pelo incentivo e companheirismo durante a execução deste trabalho.

À minha amiga e irmã, Lucineide, pela infinita dedicação.

Aos mensageiros do Senhor e ao meu Anjo Guardião que sempre intercederam e velaram por mim.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo, contribuindo para mais um passo na ciência.

À minha querida amiga Joelma Carvalho que muito me ajudou e incentivou.

À Dra Andréa Doria e minha coorientadora Dra Ana Lúcia, pois, sem elas eu não teria conseguido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edmundo Lopes, pela dedicação, incentivo, apoio e confiança durante minha jornada.

A todos os Residentes do Ambulatório de Hepatologia, que sempre estiveram prontos a colaborar.

Aos Hepatologistas: Dr. Tibério Medeiros, Dr. Demétrius, Dra. Lilian Rose, Dr. Marcelo, que encaminharam pacientes ao Hospital das Clínicas.

À Dra Claudia Vidal, pela compreensão e incentivo.

“As batalhas mais importantes em nossas vidas, são as que lutamos diariamente no silêncio de nossa alma” (SOLANGE S S, 2019).

RESUMO

O estágio da fibrose hepática é preditor no prognóstico e na definição terapêutica da doença hepática e a biópsia hepática é considerada “padrão ouro”. Porém, métodos não invasivos vêm sendo desenvolvidos, como os escores APRI (Platelet Ratio Index), o FIB-4 (fibrosis-4 Index) e exames de imagem, como o “acoustic radiation force impulse” (ARFI), e recentemente, a galectina 3 (GAL- 3). O objetivo deste estudo é avaliar o estágio da fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV), através dos escores APRI e FIB-4 e quantificação de GAL-3, tendo como padrão a rigidez hepática aferida pela elastografia hepática (ARFI) como padrão e construir modelo matemático combinado, Análise de Classes Latentes (ACL). Estudo de coorte transversal com pacientes com infecção pelo HBV, realizaram elastografia (ARFI) e venopunção para quantificação de GAL-3 e cálculos dos escores APRI e FIB-4, cujo desempenho foi avaliado através das respectivas curvas ROC. Em seguida, realizou-se a ACL. Estudados 109 pacientes, sendo 61 do sexo masculino, com média de idade de 43 anos, foram estratificados de acordo com a elastografia, com ponto de corte 1,21, em dois grupos: fibrose significativa ($\geq F2$) com 38 pacientes e não significativa ($< F2$) com 71 pacientes. Foram incluídos neste estudo 109 pacientes, sendo 61 masculinos, média de idade de 43 anos. De acordo com a separação pela elastografia em: fibrose significativa = 38 (34,86%) e não significativa = 71 (65,13%) pacientes. Através da curva ROC foi identificado ponto de corte para o APRI = 0,37, com sensibilidade = 63% e especificidade = 63%, AUC = 0,661; e para o FIB-4 = 1,59 com sensibilidade = 47% e especificidade = 87%, AUC = 0,676. Através da curva ROC construída pela ACL foi identificado ponto de corte para o APRI = 0,33, AUC = 0,83, com sensibilidade = 69% e especificidade = 93%; e para o FIB-4 = 1,33, AUC = 0,93, com sensibilidade = 100% e especificidade = 96%. A GAL-3 foi quantificada em 103 pacientes, tendo o ARFI como padrão-ouro, e estratificados, em fibrose significativa ($\geq F2$) = 36 (34,95%) pacientes e não significativa = 67 (65,05%) pacientes e mediana de GAL-3 3,52 ng/mL para fibrose significativa ($\geq F2$) e 2,50 ng/mL para fibrose não significativa ($< F2$) ($p = 0,014$). Através da curva ROC foi identificado ponto de corte para a GAL-3 = 3,83, com sensibilidade = 47,2% e especificidade = 76,1%, AUC = 0,623. Através da curva ROC construída pela ACL foi identificado ponto de corte para o GAL-3 = 2,56, AUC = 0,59, com sensibilidade =

81,82 e especificidade = 45,65 %. Neste estudo, tendo como padrão a fibrose hepática aferida pela elastografia (ARFI), verificou-se modesta acurácia do APRI, do FIB-4 e da GAL-3. Já através da ACL, verificou-se que o índice FIB-4 e GAL-3 apresentaram boa acurácia e seriam capazes de evitar a biópsia em grande parte dos casos, na identificação de pacientes com fibrose significativa pelo HBV.

Palavras-Chave: Técnicas de Imagem por Elasticidade. Cirrose hepática. Hepatite B crônica. Curva ROC. Biomarcadores.

ABSTRACT

The stage of liver fibrosis is a predictor of the prognosis and therapeutic definition of liver disease, and liver biopsy is considered a "gold standard". However, non-invasive methods have been developed, such as the APRI (Platelet Ratio Index), FIB-4 (fibrosis-4 Index) and imaging tests, such as the acoustic radiation force impulse (ARFI). galectin 3 (GAL-3). The objective of this study was to evaluate the stage of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection using the APRI and FIB-4 scores and GAL-3 quantification, with hepatic stiffness as measured by hepatic elastography (ARFI) as standard and construct combined mathematical model, Latent Class Analysis (ACL). A cross-sectional study with patients with HBV infection performed elastography (ARFI) and venipuncture for quantification of GAL-3 and APRI and FIB-4, whose performance was evaluated through the respective ROC curves. The ACL was then performed. RESULTS: A total of 109 patients, 61 males, with a mean age of 43 years, were stratified according to the elastography, with a cut-off point of 1.21, in two groups: significant fibrosis ($\geq F2$) with 38 patients and non-significant ($<F2$) with 71 patients. A total of 109 patients were included in the study, of which 61 were men, with a mean age of 43 years. According to the separation by elastography in: significant fibrosis = 38 (34.86%) and non-significant = 71 (65.13%) patients. Through the ROC curve, APRI = 0.37, with sensitivity = 63% and specificity = 63%, AUC = 0.661; and for FIB-4 = 1.59 with sensitivity = 47% and specificity = 87%, AUC = 0.676. Through the ROC curve constructed by ACL, APRI = 0.33, AUC = 0.83, with sensitivity = 69% and specificity = 93% were identified; and for FIB-4 = 1.33, AUC = 0.93, with sensitivity = 100% and specificity = 96%. GAL-3 was quantified in 103 patients, with ARFI as gold standard, and stratified in significant fibrosis ($\geq F2$) = 36 (34.95%) patients and non-significant = 67 (65.05%) patients and median GAL-3 was 3.52 ng / mL for significant fibrosis ($\geq F2$) and 2.50 ng / mL for non-significant fibrosis ($<F2$) ($p = 0.014$). Through the ROC curve cut-off point was identified for GAL-3 = 3.83, with sensitivity = 47.2% and specificity = 76.1%, AUC = 0.623. Through the ROC curve constructed by ACL, the cut-off point for GAL-3 was 2.56, AUC = 0.59, with sensitivity = 81.82 and specificity = 45.65%. In this study, as measured by hepatic fibrosis measured by elastography (ARFI), there was a modest accuracy of APRI, FIB-4 and GAL-3. Already through ACL, the FIB-4 and GAL-3 indexes were found to be accurate and would be able to

avoid biopsy in most cases, in the identification of patients with significant fibrosis by HBV.

Keywords: Elasticity imaging techniques. Hepatical cirrhosis. Chronic hepatitis B. ROC curve. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura		
Figura 1-	O vírus da hepatite B: antígenos e anticorpos identificados no sangue.	22
Figura 2-	Fases da Hepatite B crônica.	26
Elastografia		
Figura 3-	Elastografia hepática através da metodologia ARFI.	35
Galectinas		
Figura 4-	Estrutura base, monômero, dímero e arranjo molécula das galectinas.	38
Figura 5-	Dímero e arranjo molecular da estrutura básica de galectinas.	38
Figura 6-	Monômero, pentâmero e arranjo molecular de GAL-3.	39
Figura 7-	O papel da Gal-3 na apoptose celular, adesão, migração, angiogênese e inflamação.	42
Artigo 1 - Resultados		
Figura 1-	Curvas ROC (receiver operator characteristic curve) representando o desempenho das variáveis APRI e FIB-4 na avaliação da fibrose hepática, tendo como padrão a elastografia ARFI de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.	62
Figura 2-	Curvas ROC (receiver operator characteristic curve) representando o desempenho das variáveis APRI, FIB-4 e ARFI na avaliação da fibrose hepática, de acordo com a análise de classe latente, em 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.	64
Figura 3-	Curvas ROC (receiver operator characteristic curve) representando o desempenho das variáveis APRI, FIB-4 aferidas pela elastografia ARFI, com ponto de corte 1,26m/s dos 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.	66
Artigo 2 - Resultados		
Figura 1-	Curvas ROC (receiver operator characteristic curve) representando o desempenho da GAL-3 na avaliação da fibrose hepática, tendo como padrão a elastografia ARFI de 103 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.	83

LISTA DE TABELAS

	Categorização das variáveis	
Tabela 1-	Tabela de categorização das variáveis independentes	46
Tabela 2-	Tabela de categorização da variável dependente	47
	Artigo 1 - Resultados	
Tabela 1-	Características demográficas e clínico-laboratoriais de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019	60
Tabela 2-	Características demográficas e clínico-laboratoriais de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B de acordo com o grau de fibrose hepática aferida pela elastografia ARFI, Recife, 2019.	61
Tabela 3-	Desempenho dos pontos de corte obtidos pela curva ROC (<i>receiver operator characteristic curve</i>) para avaliação da fibrose leve ou significativa com as variáveis APRI e FIB=4, tendo a elastografia ARFI como padrão ouro (1,21 m/s), em 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019.	63
Tabela 4-	Desempenho do APRI, FIB-4 e ARFI na predição da fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HBV, ajustada pela análise de classes latentes.	63
Tabela 5-	Tabela representativa das probabilidades calculadas pela análise de classe latente para as variáveis APRI, FIB-4 e ARFI dos 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.	65
Tabela 6-	Desempenho dos pontos de corte obtidos pela curva ROC (<i>receiver operator characteristic curve</i>) para avaliação da fibrose leve ou significativa com as variáveis APRI e FIB=4, tendo a elastografia ARFI como padrão ouro (1,26 m/s), em 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019.	66
	Artigo 2 - Resultados	
Tabela 1-	Características demográficas e clínico-laboratoriais de 103 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019	81
Tabela 2-	Características demográficas e clínico-laboratoriais de 103 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, de acordo com o grau de fibrose hepática aferidos pela elastografia ARFI, com ponto de corte da literatura (1,21 m/s), Recife, 2019	82

Tabela 3- Desempenho dos pontos de corte obtidos pela curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) para avaliação da fibrose leve ou significativa com a variável GAL-3, tendo a elastografia ARFI como padrão ouro (1,21 m/s), em 104 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL	análise de classe latente
APRI	<i>Aspartate aminotransferase to platelet ratio index</i>
ALT	alaninaaminotransferase
anti-HBe	anticorpo anti antígeno e do vírus da hepatite B
ARFI	<i>acoustic radiation force impulse</i>
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	área sob a curva (<i>area under curve</i>)
BCP	promotora basal do core
Bil-T	bilirrubinas totais
cccDNA	<i>closed circular covalent</i> DNA
CD4+	linfócitos auxiliares
CD8+	linfócitos supressores
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CHB	hepatite B crônica
CRD	domínio de reconhecimento de carboidratos
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	ácido desoxirribonucleico
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
FIB-4	<i>fibrosis-4 score</i>
GAL-3	galectina-3
GGT	gama glutamil transferase
HBcAg	antígeno <i>core</i> do vírus da hepatite B
HBeAg	antígeno e vírus da hepatite B
HBsAg	antígeno de superfície da hepatite B
HBV	vírus da hepatite B
HBV DNA	DNA do vírus da hepatite B
HBx	polimerase e proteína X
HCC	carcinoma hepatocelular
HCV	vírus da hepatite C
IFN	Interferon
IL-10	interleucina 10
INR	índice internacional normalizado
IQR	intervalo interquartil
KD	kilo Dalton
LR -	Razão de verossimilhança negativa
LR +	Razão de verossimilhança positiva
LF	<i>liver fibrosis</i> - fibrose hepática
LS	<i>liver stiffness</i> - rigidez hepática
LSN	limite superior de normalidade
m/s,	metro/segundos
M2BPGi	indicador de fibrose
MEC	matriz extracelular
METAVIR	escore correspondente ao estágio da fibrose.

MFb	miofibroblastos
mg/mL	nanograma/mililitros
mHz	mega Hertz
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	precore
pg/mL	picograma/mililitros
Plt	plaquetas
PT	proteínas totais
qPCR	reação de cadeia de polimerase quantitativa
RNA	ácido ribonucléico
RNM	ressonância magnética
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
ROI	região de interesse escolhida pelo operador
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SWE, 2D	(<i>Shear wave elastography</i>), elastografia por onda de cisalhamento bidimensional
SWE,p	(<i>Point Shear Wave</i>) elastografia por onda de cisalhamento pontual.
SWV	velocidade da onda de cisalhamento
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	elastografia transitória
Tim-3	ligante da galectina-3 ao linfócito T
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI/ml	unidades internacionais/mililitros
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	JUSTIFICATIVA	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	BIOMARCADORES	27
3.2	FIBROSE HEPÁTICA	29
3.3	ELASTOGRAFIA	33
3.4	ANÁLISE DE CLASSES LATENTES(ACL)	37
3.5	GALECTINAS	37
3.5.1	Galectina-3	39
4	HIPÓTESE	43
5	OBJETIVO GERAL	44
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
6	METODOLOGIA E CASUÍSTICA	45
6.1	DESENHO DO ESTUDO	45
6.2	POPULAÇÃO ALVO	45
6.3	POPULAÇÃO DE ESTUDO	45
6.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	45
6.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	45
6.6	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS	46
6.6.1	Variáveis independentes	46
6.6.2	Variável dependente	47
6.7	OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO	47
6.8	DETERMINAÇÃO DE ALT, AST, GGT E FOSFATASE ALCALINA	47
6.9	HEMOGRAMA (PLAQUETAS)	48
6.10	INR	48
6.11	APRI	48
6.12	FIB-4	48
6.13	DETERMINAÇÃO DO HBSAG, HBEAG E ANTI-HBE	48
6.14	QUANTIFICAÇÃO DO HBV DNA	48
6.15	QUANTIFICAÇÃO DA GAL-3	49
6.16	ELASTOGRAFIA (ARFI)	49

6.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6.18	RISCOS	51
6.19	BENEFÍCIOS	51
6.20	DESFECHOS	51
6.21	ASPECTOS ÉTICOS	51
7	RESULTADOS	53
7.1	ARTIGO – 1 AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA ATRAVÉS DA ELASTOGRAFIA, BIOMARCADORES SÉRICOS E ANÁLISE DE CLASSE LATENTE NA HEPATITE B CRÔNICA	53
7.2	ARTIGO – 2 ARTIGO 2 – GALECTINA-3 COMO PREDITOR DE FIBROSE HEPÁTICA TENDO A ELASTOGRAFIA ARFI COMO PADRÃO DE RIGIDEZ HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B	74
8	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	97
	APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS	99
	APÊNDICE C – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS	101
	APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS	120
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE (anterior a emenda)	134
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE (após a emenda)	136
	ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS HC/UFPE	139

1 INTRODUÇÃO

A determinação do grau da fibrose hepática é importante elemento no prognóstico e consequentemente na seleção da terapêutica para a doença hepática. Para tal, a biópsia hepática, ainda é considerada “padrão ouro”, embora seja método invasivo e envolva certo risco (CHOI et al., 2014).

No sentido de reduzir esses inconvenientes, vêm sendo desenvolvidos métodos não invasivos utilizando biomarcadores para estadiamento da fibrose hepática, tais como, os escores APRI (*Aspartato aminotransferase-to Platelet Ratio Index*) e o FIB-4 (*Fibrosis-4 Score*), por exemplo, e métodos físicos como a elastografia “*acoustic radiation force impulse*” (ARFI), respectivamente. Também vêm sendo investigadas como biomarcadores algumas lectinas, como a galectina 3 (CHOI et al., 2014).

Estudo realizado por JIEANU et al, (2015) comparando os métodos de ARFI, elastografia hepática transitória, ressonância magnética e o índice APRI revelou que esses métodos podem eventualmente substituir a biópsia, sobretudo na diferenciação dos estágios de fibrose mais iniciais dos mais avançados.

A elastografia transitória é o método mais validado para estadiamento da Hepatite B crônica, sendo mais efetivo para identificar pacientes com fibrose igual ou acima de F2 a F4. Os trabalhos com o ARFI e elastografia *shear wave* bidimensional (2D SWE) mostraram a mesma performance diagnóstica com maior percentual de sucesso dos exames com estas novas técnicas. (DIETRICH et al., 2017).

Da mesma forma, PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, (2017) comparando biópsia hepática com os índices APRI e FIB-4 e com o ARFI referiram que a escolha dos testes depende do custo, precisão, confiabilidade e disponibilidade do método. A constante evolução dos testes não invasivos para avaliação do estágio de fibrose vem demonstrando progressiva melhora do desempenho diagnóstico, bem como, predição prognóstica dos desfechos relacionados ao fígado. Assim, o papel da biópsia hepática vem se tornando cada vez menos proeminente.

Estudo realizado por ULU et al., (2015) comparando grupos de pacientes com hepatite crônica C, hepatite crônica B e HCC secundário à hepatite B ou C, concluíram que os níveis séricos de galectina-3 (GAL-3) poderiam indicar a progressão para cirrose ou a presença de HCC. De fato, estes autores observaram que níveis séricos de GAL-3 se elevam em casos de cirrose e hepatites virais,

identificaram ainda que, hepatócitos normais expressam quantidades mínimas de GAL-3, enquanto que, ela é abundantemente expressa em fígado cirrótico e nas hepatites virais, achado comprovado pela imunohistoquímica.

De fato, este avanço na avaliação da fibrose pelo HCV por métodos não invasivos reduziu em muito a indicação de biópsia hepática para estes pacientes, dificultando indiretamente a indicação da biópsia também para os pacientes com hepatite pelo HBV.

A não realização da biópsia faz com que na prática clínica muitas vezes não se disponha de um padrão-ouro para avaliar o grau de fibrose em pacientes com infecção crônica pelo HBV. Nestas situações, vem-se empregando modelos matemáticos para variáveis que não são diretamente observáveis, as quais são denominadas variáveis latentes, e são empregadas quando não se dispõe de padrão-ouro (MASTELLA, 2015).

Análise de Classes Latentes (ACL) é um método estatístico que identifica distintos grupos (classes latentes) baseados nos padrões de respostas observadas em variáveis categóricas. Esse método investiga se a relação da covariância entre um grupo de variáveis observáveis é explicada por outra variável latente (classe). (LEÃO et al., 2017) O objetivo dessa análise é identificar subgrupos mutuamente exclusivos de indivíduos, com base em um conjunto de variáveis categóricas observadas, sabidamente relacionadas à variável latente de interesse. (MASTELLA, 2015). Nesta metodologia, um padrão de referência é construído com base na combinação de resultados de testes observados e estimados de cada paciente. (FERNANDES et al., 2017).

Considerando a necessidade de melhor avaliação de biomarcadores na estadiamento do grau de fibrose na prática clínica, este estudo tem como objetivo avaliar o estágio da fibrose hepática através dos escores APRI e FIB-4 e níveis séricos de GAL-3, tendo como padrão a rigidez do fígado aferida pela elastografia (ARFI), como também avaliar a fibrose através da Análise de Classes Latentes, admitindo-se a ausência de um exame padrão-ouro para a fibrose, em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

2 JUSTIFICATIVA

Embora a biópsia hepática seja considerada “padrão ouro” para avaliação de fibrose, constitui método invasivo, que causa desconforto e pode acarretar alguns riscos, inclusive óbito. Portanto, o estudo de biomarcadores, como o APRI e o FIB-4 e a GAL-3, tendo como padrão a elastografia hepática, faz-se fundamental na medida em que estes biomarcadores ainda não apresentam acurácia satisfatória na aferição do grau de fibrose na infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

A identificação de novos marcadores envolvidos na fibrogênese, com a GAL-3, faz-se necessário para a inclusão de mais uma ferramenta na propedêutica da fibrose do fígado de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O vírus da hepatite B (HBV), pertence à família dos hepadnavírus, possui forma circular formando vírion envelopado de 42 nm de diâmetro, também conhecido como partícula Dane. É composto por ácido desoxirribonucleico (DNA), parcialmente de cadeia dupla, sendo o único vírus hepatotrópico a possuir DNA, como material genético (WU; CHANG, 2015); (AVERHOFF, 2017).

Sua estrutura é composta por envelope lipoproteico externo, o antígeno core ou proteína do nucleocapsídeo viral, o genoma viral e a polimerase. Além disso, filamentos de proteína de superfície do vírus da hepatite B (HBs) na membrana intracelular podem levar a formação e secreção de partículas subvirais (SVPs) de 20nm de diâmetro, não infecciosas, que circulam no sangue cerca de 1.000 a 1.000.000 vezes em maior quantidade que os vírions (BUSCH; THIMME, 2015).

O DNA viral é integrado ao DNA do núcleo do hepatócito no momento da infecção, onde o DNA viral é convertido em DNA circular covalentemente fechado (*closed circular covalent* DNA-cccDNA) que serve como modelo transcricional para ácido ribonucleico (RNA) pré-genômico e RNA mensageiro (*mRNA*), para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), antígeno e do vírus da hepatite B (HBeAg), antígeno *core* do vírus da hepatite B (HBcAg), polimerase e proteína X (HBx) (WU; CHANG, 2015).

O gen da região core/precore codifica a proteína do capsídeo viral ou HBcAg e HBeAg, sua secreção é um marcador de replicação viral, mas não é necessária para a reprodução do vírus.(BUSCH; THIMME, 2015).

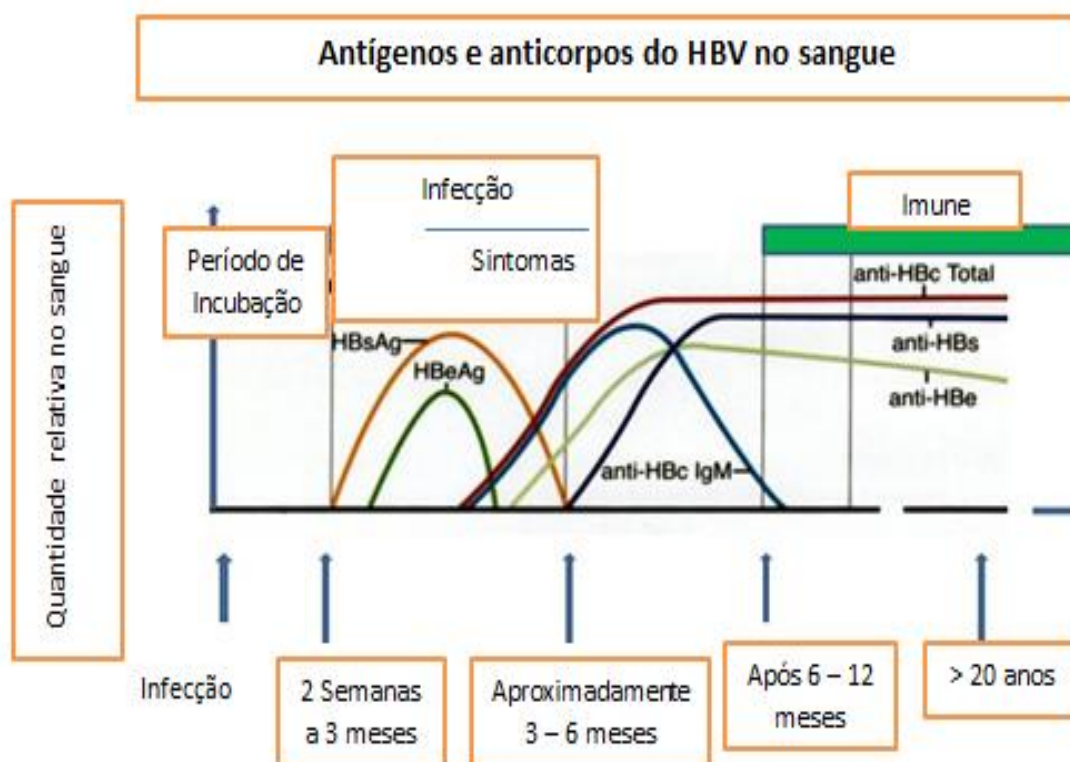
E por fim, o gen da polimerase, que codifica um primer para a transcriptase reversa e uma RNase para os domínios H, e por último o gen X, codificador da proteína X que é reguladora transcricional, a qual está relacionada a hepatocarcinogênese (BUSCH; THIMME, 2015).

O HBV humano é agrupado em 10 genótipos, baseados na diversidade completa do genoma de mais de 8% ao nível de nucleotídeos;(NORDER et al., 1994), (SUGAUCHI et al., 2001) e análises filogenéticas da sequência genômica completa classificados de A a J. (MIYAKAWA; MIZOKAMI, 2003); (TATEMATSU et al., 2009). Estudos têm demonstrado que os genótipos podem contribuir para as características clínicas e evolução da doença, como também, na resposta à terapia antiviral. (ORITO et al., 2001); (KOBAYASHI et al., 2003) (HONG DUONG et al.,

2009), (ZÖLLNER et al., 2004) . Em nossa região, o sub genótipo predominante é o A1 79%, seguido do F2a 12% (MOURA et al., 2013). A progressão da doença parece ser mais acelerada e a resposta ao tratamento com agentes antivirais é menos favorável para os pacientes infectados pelo genótipo C, comparados com aqueles infectados pelo genótipo B. (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018a).

O HBV produz antígenos que podem ser detectados no sangue e que promovem o desenvolvimento dos seus respectivos anticorpos. Os padrões desses e de outros marcadores nos direcionam para a fase da infecção (Figura 1).

Figura 1 - O vírus da hepatite B: antígenos e anticorpos identificados.



Fonte: Wikipédia (CHANG, 2007)

Estima-se que 257 milhões de pessoas tenham infecção crônica pelo HBV em todo o mundo (BOGLER; WONG; GISH, 2018). A epidemiologia da infecção pelo HBV é geograficamente diversa, com prevalência populacional, idade, modo de aquisição, e probabilidade de progressão para infecção crônica mutuamente interdependente. O ônus da infecção crônica pelo HBV é cada vez mais reconhecido, com a cirrose e o câncer de fígado. A progressão da infecção está

relacionada a uma série de fatores, incluindo o genótipo viral, a presença de coinfeções com outros vírus ou outras doenças hepáticas. O crescente reconhecimento da infecção pelo HBV como uma das principais causas de morte no mundo resultou no desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas e políticas de saúde a nível internacional (SETO et al., 2018).

Existem duas fases distintas na infecção crônica pelo HBV. A primeira fase é replicativa com doença hepática ativa e ALT sérica elevada, HBV DNA e HBeAg estão presentes. Em segundo lugar, uma fase não-replicativa, onde a ALT sérica pode normalizar, o HBeAg desaparece e aparece o anticorpo anti-HBe (Figura 2).

Em alguns pacientes, a replicação viral é suspensa, como pode ser comprovado pela quantificação do HBV DNA, embora permaneçam HBsAg-positivos. Estes pacientes têm HBV DNA indetectável e concentrações séricas normais de ALT. Nenhum sinal de dano hepático contínuo ou inflamação é encontrada na biópsia hepática. Esse estado é chamado de estado de portador inativo, anteriormente conhecido como portador sadio.(SETO et al., 2018), (YU; LEE, 2017).

Uma pequena porcentagem de pacientes continua a ter níveis moderados de HBV-DNA em replicação e doença hepática ativa (ALT sérica elevada e inflamação crônica em biópsias hepáticas), mas permanecem HBeAg-negativa. Esses pacientes com hepatite crônica HBeAg negativo podem ter vírus residual, do tipo selvagem ou variantes do HBV, que não conseguem produzir HBeAg por apresentarem a mutação precore (PC) ou promotora basal do core (BCP),.(PITA et al., 2014).

A patogênese e as manifestações clínicas da infecção pelo vírus da hepatite B são devido à sua interação com o sistema imune do hospedeiro. O sistema imunológico ataca o HBV causando lesão hepática, quando os linfócitos CD4+ e CD8+ ativados reconhecem vários peptídeos derivados do vírus na superfície dos hepatócitos. Reações imunológicas outras, tais como, liberação de citocinas, produção de anticorpos ou um estado imunológico relativamente tolerante, resultam em hepatite crônica. Em particular, ocorre uma resposta linfocitária mediada por células T, bastante restrita, contra os hepatócitos infectados pelo HBV.(NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018b).

As consequências tardias são a cirrose e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) em 15 a 30% dos indivíduos, contudo, os pacientes com essa infecção independentemente de estarem em estágio de cirrose, já são propensos a

desenvolver HCC. Nos Estados Unidos, a maioria deles, provém de origem asiática e adquiriu a doença por transmissão vertical..(NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018b)

Parte dos indivíduos infectados podem sair da fase HBeAg negativo reativando a hepatite e até mesmo desenvolver cirrose hepática ou HCC. Uma minoria de pacientes com infecção crônica por HBV pode desenvolver a soro conversão do HBsAg e livrar-se do estado de infecção crônica. A fase imunotolerante é indicada por níveis normais de ALT, altas cargas virais e presença de HBeAg. Esta fase, que dura aproximadamente 2 - 4 semanas em adultos saudáveis, representa o período de incubação, que no caso dos recém-nascidos, pode perdurar por décadas. Não há nenhuma ocorrência de dano hepático, apesar da presença dos altos níveis de HBV DNA, em função da tolerância imunológica do paciente ao HBV. Sabe-se que a replicação viral ativa continua, apesar da pouca ou nenhuma elevação nos níveis das transaminases e nenhum sintoma da doença. (COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2018),(WU; CHANG, 2015), (AVERHOFF et al., 2017) (YU; LEE, 2017),(NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018b).

A maioria dos pacientes na fase imunológica tolerará respostas imunes ao HBV à medida que envelhecem. Na maioria dos pacientes durante ou após o estágio da adolescência, os *flares* ALT e a soro conversão de HBeAg ao seu anticorpo (Anti-HBe) indica a fase *immunoclearence* / inflamatória.(COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2018), (WU; CHANG, 2015). Também denominado de imunidade ativa / liberação imunológica, ou ainda estágio de eliminação do sistema imunológico, ocorre uma reação inflamatória com efeito citopático. O HBeAg pode ser identificado nos soros e o declínio nos níveis de HBV DNA é visto em alguns pacientes que estão depurando a infecção. A duração deste estágio para pacientes com infecção aguda é de aproximadamente 3-4 semanas, período sintomático. (COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2018), (WU; CHANG, 2015), (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018).

Para pacientes que cursam com a infecção crônica, a soro conversão do HBeAg geralmente indica o decréscimo da atividade de replicação viral ativa e da hepatite, enquanto que, a soro conversão de HBeAg tardia, com viremia persistentemente alta após a 4ª década de vida, indica um risco maior de desenvolver cirrose hepática e HCC. (WU; CHANG, 2015), (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018). Esta fase caracteriza-se pelo antígeno e do vírus da hepatite B (HBeAg) positivo, níveis séricos de HBV DNA mais baixos e níveis de ALT

aumentados ou flutuantes. Os achados histológicos nessa fase incluem inflamação hepática de moderada a grave e em alguns pacientes, rápida progressão da fibrose. Tais alterações devem-se ao aumento do HBeAg ou da atividade dos linfócitos T citotóxicos específicos para este antígeno, e à consequente destruição dos hepatócitos infectados. A supressão sustentada do HBV DNA ocasionalmente acompanha a soro conversão do HBeAg. No entanto, em muitos casos, a terapia antiviral é necessária para suprimir a atividade viral em pacientes com níveis elevados de AST e ALT(YU; LEE, 2017).

O terceiro estágio é de infecção crônica inativa, quando as células imunológicas do hospedeiro passam a identificar os hepatócitos infectados com HBV. Por outro lado, a replicação viral é baixa ou não é mais mensurável no soro, e o anti-HBe passa a ser produzido, podendo ser sorologicamente detectado, embora, o HBsAg ainda esteja presente no soro, os níveis de aminotransferases estão dentro do intervalo de referência. (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018).

Estudar a história natural dos portadores inativos atualmente é dificultado pelo pequeno número de estudos. Quando definido corretamente, o estado de portador inativo apresenta um prognóstico muito bom no espectro da infecção crônica por hepatite B, com baixas taxas de reativação, carcinoma hepatocelular e progressão da doença para cirrose. Além disso, a depuração do antígeno de superfície da hepatite B é mais comum em portadores inativos em comparação com a população geral infectada pelo HBV. A reativação é mais provável durante os primeiros anos de acompanhamento e durante as terapias imunossupressoras. O tratamento antiviral profilático deve ser iniciado o mais cedo possível neste último caso (PITA et al., 2014).

Algumas pessoas erradicam a fase ativa da infecção pelo HBV, ou seja, o HBsAg dos hepatócitos infectados, por sua vez, os antígenos sorológicos passam a negativarem, os níveis de carga viral passam a ser indetectáveis e as enzimas hepáticas não indicam mais sinais de dano hepático. Apesar de a infecção tornar-se inativa, estudos mostram que dois terços da população nunca desenvolverão anti-HBs. Vale salientar que, o desenvolvimento de anticorpos de superfície não é mais o padrão ouro para a recuperação da hepatite B, pois, segundo Dr. Gish, consultor médico da Fundação Hepatite B e professor consultor de gastroenterologia e hepatologia na Universidade de Stanford, os anticorpos de superfície que os laboratórios quantificam, podem ligar-se a qualquer HBsAg que permaneça após a

infecção, portanto, pode não haver qualquer excesso desse tipo de anticorpos de superfície para se mensurar. (GISH, 2016).

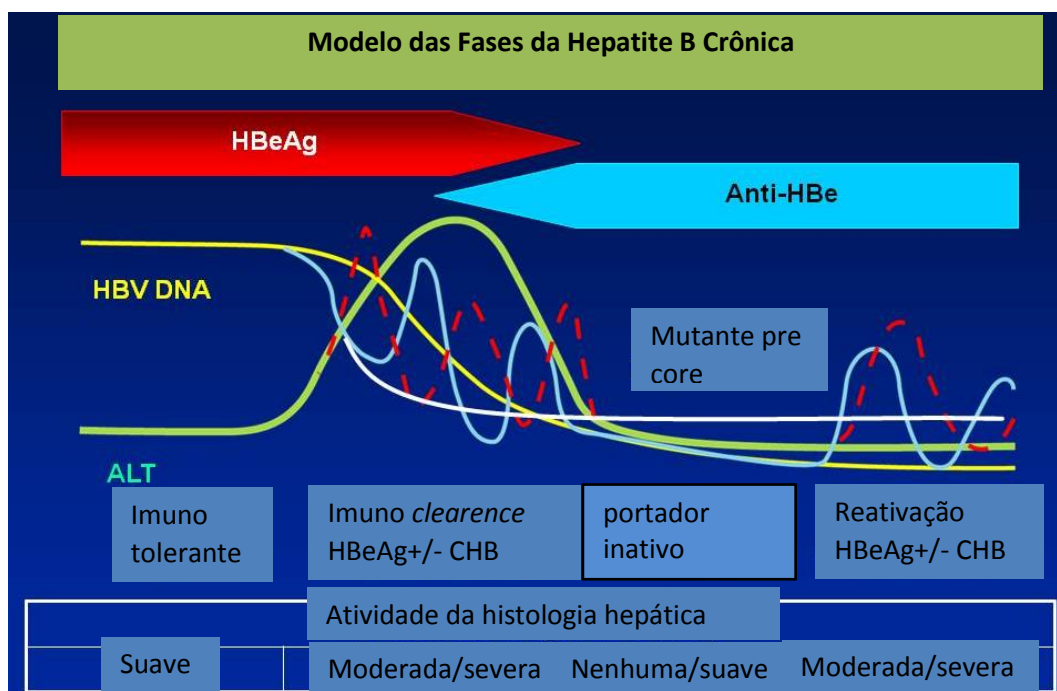
As diretrizes atuais não recomendam rotineiramente a biópsia hepática em portadores inativos. No entanto, alguns podem ter fibrose hepática significativa no diagnóstico e, portanto, não podem ser classificados como tal; outros podem desenvolver fibrose durante o seguimento e, conseqüentemente, evoluir com pior prognóstico. (PITA et al., 2014).

Apesar de algumas limitações, a elastografia transitória (TE), parece ser abordagem satisfatória para identificar esses pacientes e para monitorar em série as alterações hepáticas em portadores inativos (PITA et al., 2014).

A quarta fase ocorre com o surgimento da hepatite B crônica HBeAg-negativa a partir do estágio de infecção crônica inativa (estágio 3) ou diretamente do estágio de ativação / eliminação imunológica (estágio 2). (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018).

Na quinta etapa, o vírus não pode ser detectado no sangue por quantificação de HBV DNA, ou HBsAg. (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018).

Figura 2 - Fases da Hepatite B crônica.



Fonte: hepb.org

3.1 BIOMARCADORES

Com os recentes avanços nas investigações moleculares e genômicas, o impacto dos fatores virais sobre hospedeiro na progressão da infecção crônica por HBV vem se tornando bastante relevante no acompanhamento e prognóstico da hepatite B crônica (LIN; KAO, 2016)., (HADZIYANNIS; LARAS, 2018).

Os biomarcadores são ferramentas para o monitoramento da infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV), tanto em seu curso natural, quanto durante e após o tratamento. São utilizados para determinar a fase da infecção crônica e consistem na presença ou ausência de HBeAg e anti-HBe, acrescidos, dos níveis de HBV DNA. As aminotransferases (AST e ALT) também são sensíveis marcadores de inflamação hepática, bem como da presença ou ausência de necroinflamação intra-hepática e fibrose. As combinações desses marcadores fornecem informações sobre a presença de atividade imunológica intra-hepática, cuja mensuração, traduz-se na quantificação dos danos às células hepáticas, o que pode inferir o prognóstico e determinar o início de tratamento. (TANG et al., 2018).

Os biomarcadores virais, consistem em anticorpos contra epítopos virais, proteínas virais e marcadores substitutos moleculares da quantidade e atividade transcricional do *closed circular covalent* DNA (cccDNA) do HBV episomal que está localizado nos núcleos dos hepatócitos infectados. O cccDNA viral é a forma genômica chave que é responsável pela persistência da infecção e demonstrou persistir no fígado de pacientes infectados, mesmo após terapia de longa duração com nucleot(s)ídeo análogos (NA), perda do HBsAg ou soro conversão.

Além disso, a atividade transcricional do cccDNA é controlada pela regulação epigenética fina que pode envolver tanto fatores virais, quanto do hospedeiro. Porém, a principal limitação dos estudos de cccDNA é a biópsia hepática; assim, os biomarcadores substitutos estão sendo avaliados. Vale ressaltar que nem todas as transcrições são expressas do cccDNA, mas também podem ser expressas a partir de sequências virais integradas ao genoma do hospedeiro. A replicação do genoma viral não pode ocorrer a partir desses integrantes, mas, a expressão do HBsAg pode ocorrer também de qualquer gene do envelope em cccDNA e / ou em integrantes virais, explicando, pelo menos em parte, por que a quantificação do HBsAg não é um biomarcador perfeito para a quantificação do cccDNA intra-hepático, cujos níveis e atividade transcricional serão importantes em ensaios clínicos que avaliam

conceitos inovadores de tratamento para curar a infecção pelo HBV. Por sua vez, o ácido desoxirribonucleico (DNA) do HBV ou outra medição da carga viral no plasma ou no soro é um marcador da replicação do HBV de grande importância clínica. (COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2018), (HADZIYANNIS; LARAS, 2018), (LIN; KAO, 2016) (LAMPERTICO et al., 2017)

Em relação aos fatores virais, a carga viral é um forte preditor para avaliar a progressão da doença hepática. O nível sérico de HBsAg serve como um marcador complementar à carga viral para a predição de resultados adversos relacionados ao HBV em pacientes com baixa carga viral. Nas pessoas com baixa carga viral, o nível sérico alto de HBsAg está associado a maiores riscos de cirrose e HCC (LIN; KAO, 2016). Os genótipos de HBV e mutantes (promotor basal do núcleo e mutação de deleção nos genes pré-S) são marcadores genéticos virais bem conhecidos para prever a progressão da doença. Em relação aos fatores do hospedeiro, os biomarcadores inflamatórios séricos são utilizados para avaliar a necroinflamação e fibrose hepática associada ao HBV. (COFFIN; ZHOU; TERRAULT, 2018), (HADZIYANNIS; LARAS, 2018), (LIN; KAO, 2016).

Os biomarcadores virais usados para determinar a fase da infecção crônica pelo HBV consiste na presença ou ausência do HBeAg. Pois, após a soro conversão a partir do HBeAg, com o aparecimento do anti-HBe observa-se valores mais baixos do HBV DNA. Além disso, avalia-se os níveis séricos de ALT, como marcador de inflamação hepática, para avaliar o estado da doença e a necessidade de tratamento, presença ou ausência de necroinflamação intra-hepática e fibrose.

A doença ativa crônica pelo HBV é categorizada em doença HBeAg-positiva e HBeAg-negativa. (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018).

No primeiro caso, sendo do subtipo “selvagem” ou HBeAg positivo, os pacientes têm elevação de leve a moderada das aminotransferases (≤ 5 vezes o LSN) e os níveis de ALT são geralmente mais altos que os níveis de AST. A elevação destas enzimas é mais pronunciada durante a exacerbação ou reativação da doença, podendo ser acompanhada por função sintética prejudicada do fígado, isto é, diminuição dos níveis de albumina, aumento dos níveis de bilirrubina e tempo prolongado de protrombina. (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018).

Conforme o *Guidelines da European Association for the Study of the Liver* (EASL) de 2017, pacientes que não são candidatos à terapia antiviral devem ser monitorados com avaliações periódicas de ALT sérica e HBV DNA, bem como, na

realização de marcadores não invasivos para avaliar a progressão de fibrose hepática. Portanto, os pacientes com infecção crônica HBeAg-positiva que permanecerem sem tratamento, preferencialmente, deverão ter as determinações de ALT pelo menos a cada 3 meses, as determinações do HBV DNA a cada 6 ou 12 meses e a estadiamento de fibrose hepática a cada 12 meses. (LAMPERTICO et al., 2017)

Por outro lado, pacientes com infecção crônica pelo HBV com HBeAg-negativo e HBV DNA < 2.000 UI/mL deverão ter determinações de ALT a cada 6 ou 12 meses, avaliações periódicas de HBV DNA e estadiamento de fibrose hepática, a cada 2 ou 3 anos. Determinações quantitativas dos níveis séricos de HBsAg, podem ser úteis. Pacientes com níveis de HBsAg < 1,000 UI/mL, deverão quantificar os níveis de ALT a cada 12 meses e fazer o estadiamento de fibrose hepática e a quantificação do HBV DNA a cada 3 anos. Já para pacientes com os níveis séricos do HBsAg $\geq$ 1.000 UI/mL, deve-se fazer o acompanhamento com ALT a cada 6 meses, quantificação do HBV DNA e estadiamento da fibrose hepática pelo menos a cada 2 anos. (LAMPERTICO et al., 2017).

Se os níveis de AST forem mais altos do que os níveis de ALT, o diagnóstico de cirrose deve ser considerado. Essa observação é apoiada pelo fato de que a relação AST/ALT > 1 pode ser encontrada em cerca de 80% dos pacientes com cirrose secundária à etiologia viral, em contraste com apenas 4% dos pacientes com hepatite viral crônica. (NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, 2018b)

3.2 FIBROSE HEPÁTICA

A fibrose tecidual é um processo progressivo caracterizado pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC), levando à cicatrização excessiva dos tecidos, lesão de órgãos e declínio da função, chegando à falência (LI; LI; GAO, 2014). Avanços recentes indicam que as fibroses dos órgãos compartilham características que incluem lesão, disfunção epitelial e endotelial; proliferação anormal de miofibroblastos (MFb), células musculares lisas e células estreladas, e deposição da MEC. Além disso, uma variedade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos regulam a ativação de células produtoras de MEC em processos pró fibróticos. (LI; LI; GAO, 2014).

Os miofibroblastos hepáticos são células fibrogênicas heterogêneas, com funções múltiplas. As células hepáticas estreladas (HSCs) são consideradas uma importante fonte de células fibrogênicas, enquanto os fibroblastos portais desempenham importante papel no processo fibrogênico durante a colestase nas hepatopatias, como fontes adicionais de miofibroblastos hepáticos incluem fibrócitos circulantes e células derivadas da medula óssea, que também originam miofibroblastos hepáticos. (MALLAT; LOTERSZTAJN, 2013)

A fibrose hepática é dirigida por uma população de miofibroblastos hepáticos ativados que apresentam propriedades fibrogênicas, incluindo aumento da proliferação e sobrevivência, secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, aumento da síntese de proteínas de matriz e inibidores da degradação da matriz, levando à formação progressiva de cicatriz. Por causa de suas propriedades contráteis, essas células também contribuem para o desenvolvimento da hipertensão portal. (MALLAT; LOTERSZTAJN, 2013)

Além da fibrogênese, os miofibroblastos hepáticos secretam fatores angiogênicos; como tal, contribuem para a reação angiogênica durante a lesão hepática crônica criando um ambiente propício ao crescimento de tumor. Finalmente, a secreção de miofibroblastos hepáticos contribui para a regeneração hepática liberando fatores que controlam a proliferação de células de hepatócitos e progenitores. (MALLAT; LOTERSZTAJN, 2013)

O estágio da fibrose hepática é importante elemento, tanto para indicar prognóstico quanto para selecionar a terapia apropriada para os pacientes com doença hepática crônica. Para a definição do grau de fibrose, a biópsia hepática tem sido considerada o “padrão ouro”, mas, é de natureza invasiva, com riscos de complicações que variam de dor a eventos mais graves relacionados à taxa de hospitalização de 1,4 a 3,2% e mortalidade variando de 0,0088 a 0,3%. (CHOI et al., 2014) (QI et al., 2018).

A gravidade da lesão hepática e a progressão da fibrose dependem de tempo e intensidade que os ataques imunológicos persistirem. Uma transição rápida e precoce de HBeAg para anti-HBe normalmente resulta em um curso clínico silencioso, chamado de estado de portador inativo. Por outro lado, uma transição lenta e difícil, acompanhada de agressões aos hepatócitos e agravamento de hepatite crônica, resulta em hepatite ativa crônica ou cirrose hepática. É importante ressaltar que a maioria dos pacientes se tornarão portadores inativos

independentemente de seu curso clínico (OHKOSHI et al., 2016). Porém, mesmo na condição de portador inativo, PAPATHEODORIDIS et al., (2012) identificaram, em revisão sistemática, que a prevalência de atividade inflamatória e fibrose moderada, foi de 1% a 1,4% entre os pacientes com níveis de HBV DNA < 2.000 UI/mL, e 7% a 10% entre pacientes com níveis de HBV DNA entre 2.000 UI/mL e 20.000 UI/mL.

A fibrose hepática é um processo dinâmico, associado a um ciclo de deposição e degradação da matriz extracelular (MEC). Biomarcadores que espelham o *turnover* da MEC podem ser usados para avaliar mudanças dinâmicas na fibrogênese do fígado, portanto, tanto para o estadiamento da fibrose, como também para monitorar a sua progressão ou a regressão (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017).

Os biomarcadores séricos de fibrose hepática, são classificados em dois componentes diretos e indiretos na avaliação do status da fibrose. Enquanto os marcadores diretos refletem a fisiopatologia da fibrogênese hepática, representando os componentes da matriz extracelular, a outra classe segue a consequência do dano hepático com a análise laboratorial de rotina. Para uma melhor avaliação, vários escores combinando esses biomarcadores foram propostos. O teste APRI é utilizado em diversos estudos, usando a fórmula $AST / \text{limite superior do normal} * 100 / \text{contagem de plaquetas}$, é possível uma estimativa de fibrose, uma vez que os sinais de hipertensão portal resultam num declínio da contagem de plaquetas (JIEANU et al., 2015).

Portanto, um teste não invasivo ideal para identificar e/ou estadiar a fibrose, deverá ser simples, acurado e sem riscos (ATAYAN, 2017). O índice APRI, escore FIB-4, *age-platelet index* (AP), *AST/ALT Ratio* (AAR) são os mais utilizados entre estes testes (BURROUGHS; CHOLONGITAS, 2007). No estudo conduzido por ZHANG et al., (2010) foi detectada relação significativa entre as características histológicas e as pontuações referentes ao escore FIB-4 de 212 pacientes com doença hepática crônica pelo HBV.

Da mesma forma, TSENG et al., (2018b) numa coorte de 2.075 indivíduos com HBV DNA positivo, identificaram 326 pacientes com FIB-4 < 1,29 (79,90%) e verificaram que este grupo estava associado a baixo risco de cirrose e suas complicações, quando comparado com o grupo de 82 pacientes com FIB-4 >1,29 (20,1%). Concluíram que o escore FIB-4 é um marcador preditor de fibrose independente da idade, sexo, HBeAg, genótipo, status BCP, HBV DNA e HBsAg.

Além disso, sugeriram que o escore FIB-4 > 1,29 poderia ser empregado para avaliar o risco de cirrose e mortalidade em pacientes com HBV não-cirróticos. O FIB-4 pode também ser considerado uma ferramenta útil na indicação de tratamento de pacientes com hepatite B crônica (TSENG et al., 2018a), (UNALP-ARIDA; RUHL, 2017).

Outro marcador, também utilizado como preditor de fibrose significativa é o índice APRI, recentemente validado pelo *Organização Mundial de Saúde* (OMS) (AYED et al., 2017), foi originalmente considerado marcador não invasivo para a detecção de fibrose hepática em pacientes com hepatite B e C crônica. O APRI tem sido usado para prever a mortalidade relacionada às hepatopatias em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C crônica ou doença hepática alcoólica, e provavelmente, hepatopatias pelo HBV (MAO et al., 2016). Em recente revisão de meta-análise, (XIAO; YANG; YAN, 2015), demonstraram que o APRI e o FIB-4 têm moderada acurácia diagnóstica para predição de fibrose em pacientes com infecção crônica HBV. Embora a acurácia diagnóstica do FIB-4 e do APRI não seja alta, estes índices podem ser considerados como opção para a predição de fibrose causada pela infecção pelo HBV em regiões com recursos limitados de assistência médica.

Todavia, em meta-análise publicada por JIN et al., (2012), observou-se que o APRI tem aplicação limitada na identificação da fibrose significativa ou cirrose pelo HBV. Adicionalmente, outros autores, avaliando a relação custo-eficácia de vários testes não invasivos para informar as decisões de tratamento em pacientes com hepatite B crônica, mostraram que tanto o APRI quanto o FIB4 não eram tão eficazes quanto a elastografia transitória (TE), (CROSSAN et al., 2015).

A fim de aumentar a precisão do diagnóstico de testes não invasivos, modelos combinados (dois ou mais testes) vêm sendo aplicados. Com efeito, LI; LI; GAO, (2014) usaram abordagem dupla para avaliar o estágio de fibrose de 307 pacientes com HBV, combinando o APRI ou FIB-4 com elastografia hepática por *FibroScan*®, verificaram redução significativa na necessidade de biópsia hepática comparada a qualquer um dos testes avaliados isoladamente (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017).

Assim, os biomarcadores vêm sendo avaliados, tanto isoladamente quanto em combinação com outros marcadores de fibrose hepática, tais como FIB-4 e o APRI, o qual principalmente este último tem sido considerado de moderada acurácia diagnóstica, na predição da fibrose pelo HBV (XIAO; YANG; YAN, 2015) conforme

sua utilidade diagnóstica, entre os quais, também se encontra a Galectina 3.(GUDOWSKA et al., 2015).

No Brasil, os estudos referentes à fibrose hepática, elastografia e biomarcadores, em sua maioria, são relacionados ao HCV, enquanto que, estudos relacionados ao HBV, fibrose hepática, elastografia e biomarcadores, foi identificado apenas o de PERAZZO et al., (2015). Portanto, este estudo, ainda percorre um longo caminho a ser conhecido em nossa região.

3.3 ELASTOGRAFIA

Novas técnicas de imagem para diagnóstico e avaliação de fibrose hepática estão cada vez mais seguras e precisas, incluindo a elastografia por ressonância magnética (RNM), e elastografia por ultrassom. Dentre as técnicas de elastografia por ultrassom, as utilizadas atualmente são *Acoustic radiation Force impulse*, ARFI, traduzida como radiação acústica por ondas de cisalhamento e a elastografia por ondas de cisalhamento bidimensional (2D-SWE). Esta última técnica uma variação do ARFI, utilizando uma maior região de medida da rigidez do fígado. (HOROWITZ et al., 2017).

As técnicas de elastografia medem a rigidez hepática pela medida da velocidade de onda acústica ou mecânica induzidas, que se propagam no tecido hepático. Este processo é chamado de "shear wave " onda de cisalhamento. A velocidade da onda é maior quanto mais rígido ou mais fibrótico for o tecido hepático. (HOROWITZ et al., 2017).

No ARFI os pulsos ou ondas acústicas são enviadas para uma região do fígado escolhida através do ultrassom, que se denomina de ROI, região de interesse do observador. Geralmente a medida é feita no lobo direito distando 2 a 4 cm da cápsula do fígado, para homogeneizar as medidas (Figura 7). As ondas acústicas caminham perpendicular ao raio do ultrassom. Esses pulsos induzem a compressão do tecido e, conseqüentemente, produzem ondas de cisalhamento, localizadas, cuja velocidade é medida em m/s, que se espalham sobre a região de interesse, perpendicularmente, ao pulso de pressão acústico (CHOI et al., 2014).

Em contraste com TE, que tem uma região fixa de interesse (ROI) em uma profundidade de inserção fixa, a elastografia ARFI tem uma ROI flexível em profundidades variáveis que permite a medição de rigidez do parênquima, mesmo

em pacientes com ascite e obesidade. (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017). Entretanto, a atividade necroinflamatória pode interferir nos valores de medição de rigidez do tecido, quando se está avaliando a fibrose hepática. Além disso, a especificidade é prejudicada pela inflamação, colestase ou edema no parênquima hepático (CHOI et al., 2014) e tem menor acurácia em pacientes obesos (CASSINOTTO et al., 2013), (BRANCHI et al., 2014).

Dentre os métodos que utilizam ondas acústicas para avaliar a fibrose hepática, a tecnologia de imagem do ARFI tem como princípio a excitação mecânica do tecido, através da sonda de ultrassom, produzindo pulsos acústicos de curta duração (pulsos de pressão), em torno de 2,6 mHz, na região de interesse escolhida pelo operador (ROI.).

Qualquer técnica elastográfica, assim como o uso de elastografia transitória (TE) para avaliação da fibrose hepática, é recomendada como modalidade de primeira linha para avaliação da hepatite B crônica, ficando a biópsia hepática reservada para os casos de falha da elastografia. Além disso, a avaliação indireta da inflamação ou dano hepático, através das transaminases séricas, a quantificação da carga viral e os marcadores sorológicos para hepatite B, são consideradas ferramentas adequadas segundo as recentes atualizações das diretrizes nacionais e internacionais de prática clínica. (GILL et al., 2018).

Numa meta análise comparando TE e ARFI , a frequência de falhas de diagnóstico foi 3 vezes maior com o TE que com o ARFI (6,6% vs 2,1% $p < 0.001$) (HOROWITZ et al., 2017) .

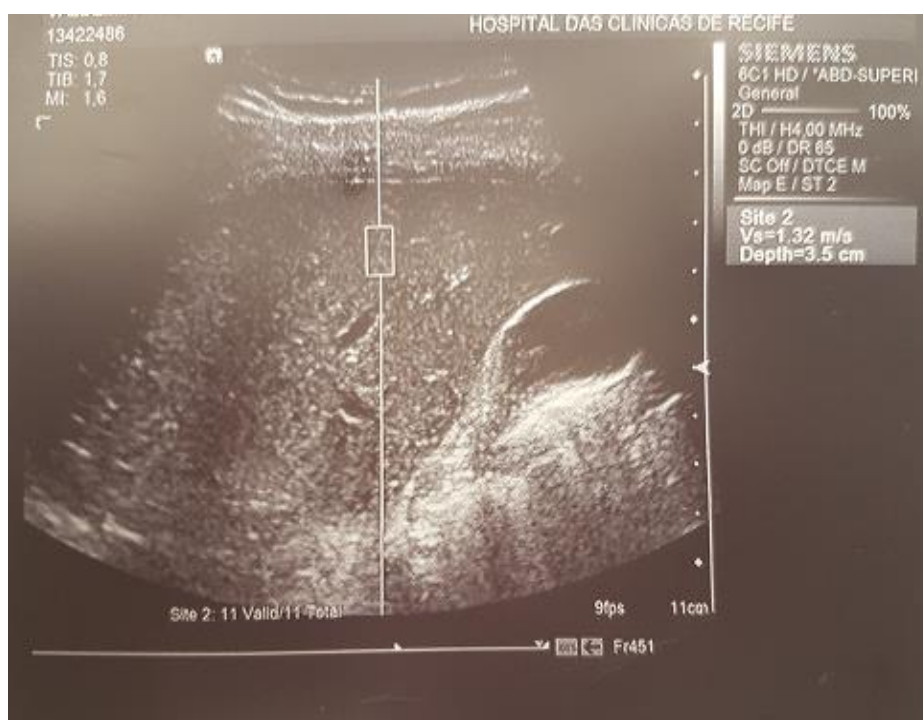
A elastografia por ondas de cisalhamento bidimensional (2D-SWE) é uma outra técnica de elastografia que usa energia acústica, semelhante ao ARFI, sendo que o aparelho é de uma outra marca, e a ROI é bem maior e o modo de medir é realizado de modo mais contínuo. Não há ainda uma experiência tão vasta na literatura com este aparelho (HOROWITZ et al., 2017).

A elastografia por ressonância magnética nuclear (RNM) é o método atual mais acurado para o diagnóstico da fibrose hepática, principalmente da fibrose em sua fase inicial em que os outros métodos falham mais. Pode apenas sofrer influência da sobrecarga de ferro que porventura o paciente venha a ter. Tem a desvantagem de ser uma técnica mais cara que as demais citadas acima, sendo sempre deixada para segunda opção nos diagnósticos (HOROWITZ et al., 2017).

Todas as técnicas de imagem foram estudadas ou validadas usando a Biopsia hepática como “padrão ouro”, ficando assim sujeitas aos mesmos erros de amostragens que ocorrem nas biopsias.

A biópsia hepática tem sido considerada “padrão ouro” na avaliação da fibrose hepática. Porém, métodos não invasivos estão melhor padronizados e vêm sendo utilizados na prática clínica para a avaliação da fibrose hepática relacionada ao HCV, enquanto que sua aplicação à fibrose induzida pelo HBV ainda persiste sob avaliação.

Figura 3 - Elastografia hepática através da metodologia ARFI



Fonte: Fotografia gentilmente cedida pela Dra Ana Lucia Coutinho/HC-UFPE, 2018.

De fato, OHKOSHI et al., (2016) referem que a elastografia transitória (TE) é uma das modalidades recentes mais confiáveis para avaliar o nível de fibrose sem a necessidade da biópsia. Vários estudos avaliaram a eficácia da TE em pacientes com e sem HCC e relataram que a acurácia diagnóstica era quase igual entre eles. No entanto, na hepatite B crônica (CHB) relata-se um menor ponto de corte para rigidez hepática do que no estágio de fibrose avançada no HCC. A interpretação disto foi que os septos fibrosos eram mais finos na hepatite B crônica do que no tecido fibróticos que geralmente aparece nos casos de HCC.

Da mesma forma, THI KHANH TUONG; NGUYEN MINH, (2018) em estudo comparativo entre biópsia hepática, ARFI e índice APRI, realizado com 119 (biópsias) /127 pacientes, sendo: 40 pacientes com hepatite crônica B ou C (33,6%), 22 com doença hepática alcoólica (18,5%) e 57 casos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (47,9%), concluíram que o ARFI e o índice APRI constituem métodos eficazes na avaliação da fibrose hepática, sendo o ARFI, significativamente melhor que o APRI para estadiamento da fibrose hepática.

Cortes equivalentes de outros métodos eletrográficos ou sorológicos para avaliação da fibrose hepática também podem ser usados, uma vez validados, em pacientes com HBV crônico.

Segundo revisão sistemática realizada por XIANGDONG HU, LANYAN QIU, DONG LIU, (2017), avaliaram um total de 2.691 pacientes e concluíram que a elastografia ARFI é um método preciso e confiável para exame em pacientes com fibrose hepática induzida pelo HBV. A acurácia do ARFI é maior na avaliação da fibrose hepática em estágio mais avançado (F3 METAVIR) e cirrose hepática (F4 METAVIR), do que nos estágios mais iniciais ($F \geq 1$ e $F \leq 2$), nos quais identificaram moderada eficácia do método.

De fato, LI et al., (2017a) em estudo comparativo com os três métodos: APRI, FIB-4 e elastografia ARFI, testados em 126 indivíduos com hepatite B crônica, observaram que a diferença na eficácia diagnóstica entre os três métodos não foi significativa. Concluíram ainda que o valor do ARFI é influenciado pelo estágio patológico do fígado, no qual, a intensidade da fibrose hepática é diretamente proporcional ao valor do ARFI, onde, mais elevado será seu valor de ponto de corte como também, a média da velocidade da onda de cisalhamento (*SWV – speed wave velocity*). Assim, inferiram ainda que a forma mais grave de fibrose hepática está associada a mudanças mais rápidas na elasticidade do fígado e na progressão da doença.

Contudo, a maioria dos estudos com marcadores séricos e de imagem para avaliar o grau de fibrose hepática envolveram pacientes com hepatite crônica pelo HCV e ainda são poucos os dados sobre a acurácia destes métodos na avaliação da fibrose induzida pelo HBV. Contudo, foi observado que os valores da rigidez hepática avaliados pelo ARFI e elastografia em relação aos estágios de fibrose da biópsia hepática foram semelhantes tanto para HCV como para HBV (SPOREA et al, 2012).

3.4 ANÁLISE DE CLASSES LATENTES (ACL)

O avanço na avaliação da fibrose pelo HCV com métodos não invasivos reduziu em muito a indicação de biópsia hepática para estes pacientes, dificultando indiretamente a indicação da biópsia também para os pacientes com hepatite pelo HBV. A não realização da biópsia fez com que na prática clínica muitas vezes não se dispusesse de um padrão-ouro para avaliar o grau de fibrose em pacientes com infecção crônica pelo HBV.

Nestas situações, vem-se empregando modelos matemáticos para variáveis que não são diretamente observáveis, as quais são denominadas variáveis latentes, e são empregadas quando não se dispõe de padrão-ouro (MASTELLA, 2015)

Análise de Classes Latentes (ACL) é um método estatístico que identifica distintos grupos (classes latentes) baseados nos padrões de respostas observadas em variáveis categóricas. Esse método investiga se a relação da covariância entre um grupo de variáveis observáveis é explicada por outra variável latente (classe). (LEÃO et al., 2017) O objetivo dessa análise é identificar subgrupos mutuamente exclusivos de indivíduos, com base em um conjunto de variáveis categóricas observadas, sabidamente relacionadas à variável latente de interesse. (MASTELLA, 2015). Nesta metodologia, um padrão de referência é construído com base na combinação de resultados de testes observados e estimados de cada paciente. (FERNANDES et al., 2017)

3.5 GALECTINAS

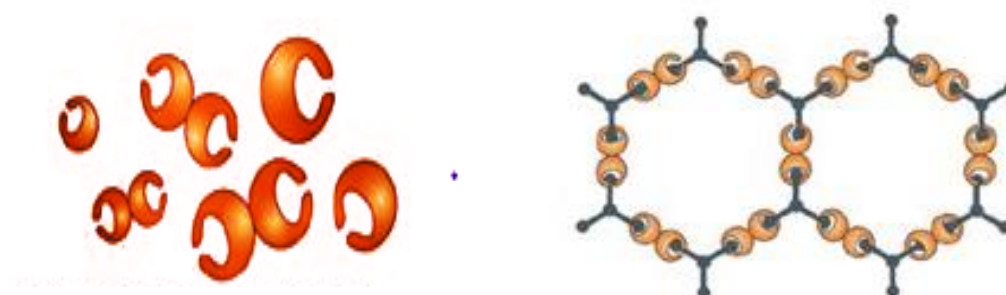
As galectinas pertencem a uma família de proteínas que se ligam a resíduos de galactose terminais em macromoléculas (Figura 3). (ULUCA et al., 2015).

As galectinas são membros de uma família recém-definida e crescente das lectinas animais. Elas desempenham papel essencial na função e no desenvolvimento de organismos multicelulares, incluindo desenvolvimento, diferenciação, adesão célula-célula, interação célula-matriz, regulação do crescimento, apoptose, *splicing* de RNA e metástase tumoral (ULU et al., 2015). Fora da célula, ligam-se a glicanos de matriz celular e extracelular, portanto, afetam variedade de processos intra e intercelulares. São ainda, detectáveis no citosol e núcleo, participando das sinalizações intracelulares através de vias de interação

proteína-proteína com outras proteínas citoplasmáticas e/ou nucleares, influenciando funções celulares, tais como, sinalização intracelular. (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Pesquisas atuais indicam que as galectinas participam de diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, respostas inflamatórias e imunológicas, progressão e desenvolvimento tumoral, degeneração neural, aterosclerose, diabetes e cicatrização. Alguns desses foram descobertos, utilizando-se camundongos geneticamente modificados, deficiente em determinada galectinas, utilizando a mesma, como alvo terapêutico (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

Figura 4 - Estrutura base, de monômero e arranjo molecular das galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15.



Fonte: RABINOVICH;TOSCANO, (2009).
Nature Reviews Immunology.

Figura 5 - Dímero e arranjo molecular da estrutura básica de galectinas 4, 6, 8, 9, 12.



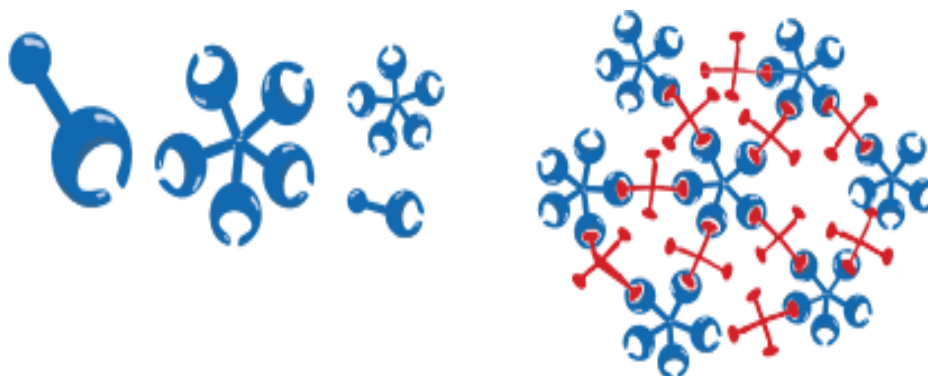
Fonte: YANG; RABINOVICH; LIU, (2008).
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press

3.5.1 Galectina-3

A GAL-3 é uma proteína de 30 kD, sendo o único membro da família das galectinas do tipo químera, é encontrada em solução como monômero e possui dois domínios funcionais (Figura 5) (ULU et al., 2015).

A GAL-3, anteriormente conhecido como o antígeno Mac-2, é uma proteína de ligação a carboidratos de -30-kDa do tipo químera (HENDERSON et al., 2006); (HENDERSON et al., 2008). É composto de um domínio curto do terminal NH₂, que decide alvos celulares específicos; possui uma sequência repetitiva semelhante ao colágeno, que serve como substrato para metaloproteinases da matriz extracelular; e um domínio carboxi-terminal que contém a região de ligação a carboidratos. (HENDERSON et al., 2008),(MOURAD-ZEIDAN et al., 2008).

Figura 6 - Monômero, pentâmero e arranjo molecular de GAL-3.



Fonte: YANG; RABINOVICH; LIU, (2008).
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2008 Cambridge University Press

Até agora é única na família a ter um domínio N-terminal extralongo e flexível que consiste em 100 a 150 resíduos de aminoácidos, de acordo com as espécies de origem, composta de uma sequência repetitiva de nove resíduos de aminoácidos ricos em prolina, glicina, tirosina e glutamina e ausência de resíduos hidrofóbicos de cadeia lateral, carregados ou grandes. (ULU et al., 2015).

O domínio N-terminal contém sítios para a fosforilação (Ser 6, Ser 12), e outros determinantes importantes para a secreção da lectina por um novo mecanismo não clássico. O terminal C é o domínio de reconhecimento de

carboidratos (CRD), consistindo em cerca de 135 resíduos de aminoácidos; o que define a molécula como galectinas e que pode formar pentâmeros

ao ligar-se a glicanos multivalentes. Conceitualmente, sua multivalência pentamérica permite que ela atue como uma ponte entre as células e a matriz extracelular, e simultaneamente, entre as células e glicanos, por dupla ligação. (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

A GAL-3 é amplamente expressa em tecidos humanos, incluindo células do sistema imunológico, células epiteliais e neurônios. Esta lectina regula as atividades das células imunológicas e contribui para a imunossupressão, uma vez que induz a apoptose de monócitos e células T, suprime a produção de IL-15 e inibe a diferenciação de células B. (BACIGALUPO et al., 2013).

Em geral, a galectina-3 é pró-inflamatória, conforme demonstrado por ensaios *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrado que a galectina-3 extracelular ativa e modula a viabilidade de células imunes e inflamatórias, embora os efeitos de Galectina-3 na sobrevivência de células T, sejam dependentes de sua secreção ser endógena (anti-apoptótica) ou secretada para o meio extracelular (pró-apoptótico). (BACIGALUPO et al., 2013).

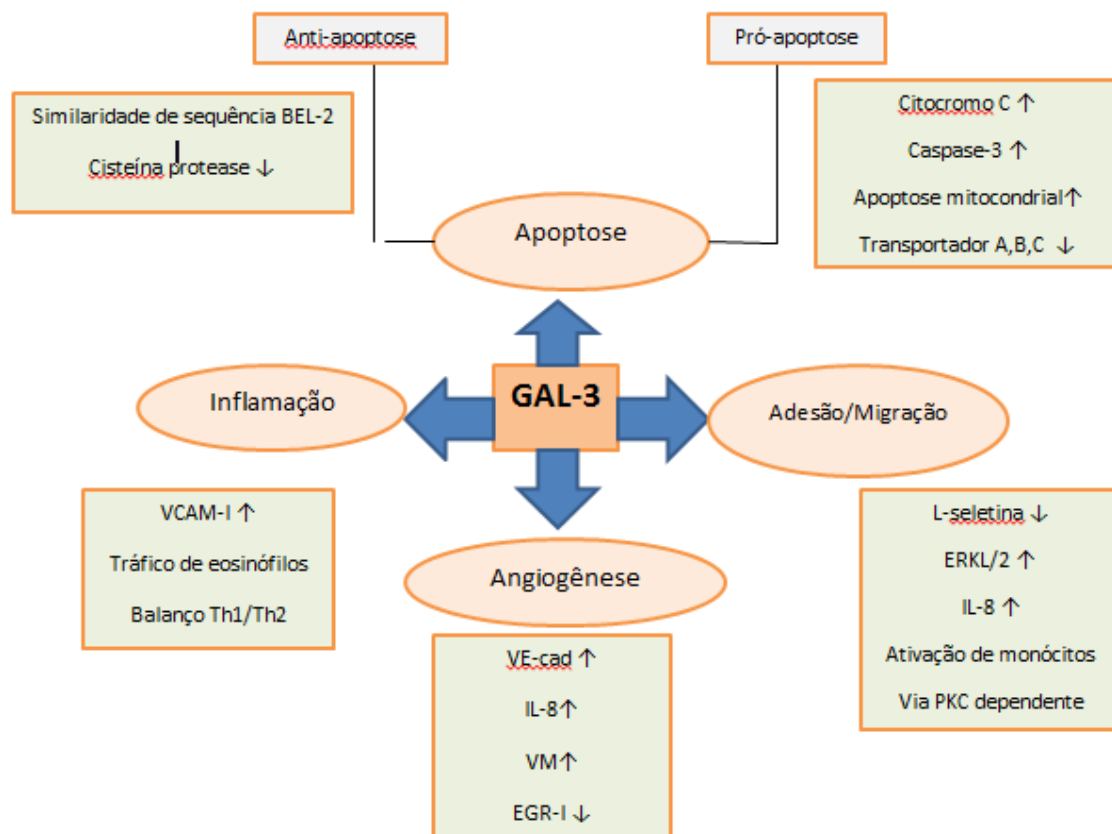
É produzida principalmente por macrófagos e está implicada em uma variedade de eventos biológicos, como inflamação e angiogênese. (NANGIA-MAKKER et al., 2000); (SANO et al., 2000), (ZUBERI et al., 2004); (ENDERSON et al., 2008). Recentemente, evidências crescentes demonstraram que a expressão de Gal-3 está aumentada na fibrose hepática, independentemente do agente iniciador ou processo da doença em pacientes fibróticos, e que seus inibidores protegem contra distúrbios fibróticos. (NISHI et al., 2007); (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008); (LOK et al., 2010); (LOPEZ-ANDRÈS et al., 2012); (MACKINNON et al., 2012); (TANIGUCHI et al., 2012); (YU et al., 2013); (BAYES-GENIS et al., 2014).

A GAL-3 estimula a produção de algumas citocinas e quimiocinas via CD98, através de interações com macrófagos (Figura 6). Desempenha importante papel na sustentação da replicação do HBV e estimula a fibrogênese diminuindo a produção de IL-10. Com base nesses dados, é considerada de grande importância na promoção do processo inflamatório, contribuindo para a progressão da infecção crônica e desenvolvimento da fibrose hepática. Assim, a GAL-3 pode ser útil para monitorar a cronicidade em diferentes fases da infecção pelo HBV. Isto sugere que a Gal-3 pode ser um importante mediador e alvo terapêutico eficaz para a fibrose

dos tecidos. Assim, uma compreensão mais completa das funções da Gal-3 e o seu papel nas doenças fibróticas pode fornecer informações importantes sobre a patogênese da fibrose e delinear novas estratégias que levam a aplicações terapêuticas. (ULUCA et al., 2015), (LI; LI; GAO, 2014).

Estudo realizado por ULU et al., (2015) avaliou 65 pacientes, sendo 24 com hepatite B ou C crônica (HCV), 22 com cirrose e 19 pacientes com HCC. Identificaram que os seguintes níveis médios de GAL-3: $5,68 \pm 2,2$ ng/mL nos cirróticos, $4,61 \pm 2,32$ ng/mL naqueles com HCC, e $1,98 \pm 1,50$ ng/mL no grupo com hepatite crônica. Não houve diferença estatística entre aqueles com HCC e os cirróticos ($P = 0,5$). Contudo, no grupo com hepatite crônica os níveis séricos de GAL-3 foram menores do que no grupo com cirrose e HCC, $p < 0,001$, $p = 0,002$, respectivamente. Quando avaliaram os níveis de GAL-3 em pacientes com HCC, foi encontrado 3,92 ng/mL em indivíduos com tumor secundário à hepatite B e 5,37 ng/mL naqueles com tumor secundário ao HCV (ULU et al., 2015). Os autores referiram, no entanto, que apesar dos valores nos grupos de tumores secundários ao HBV e HCV terem sido distintos, essa diferença não foi significativa ($p = 0,201$). No caso de pacientes cirróticos, os níveis de GAL-3 foram de 4,27 e 7,11 ng/mL em pacientes com cirrose secundária a HBV e HCV, respectivamente, sendo a diferença significativa ($p = 0,03$).

Figura 7 - O papel da GAL-3 no apoptose celular, adesão, migração, angiogênese e inflamação.



Fonte: Li; Li; Gao.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014.

4 HIPÓTESE

Há acurácia dos níveis séricos da Galectina-3, e dos escores APRI e FIB-4 e na avaliação da fibrose hepática, tendo como padrão a rigidez do fígado aferida por elastografia (ARFI), avaliados conjuntamente pela análise de classe latente, em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B?

5 OBJETIVO GERAL

Analisar a acurácia dos níveis de GAL-3 e dos escores APRI e FIB-4 na estimativa do estágio de fibrose hepática de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o estágio da fibrose hepática através dos escores APRI e FIB-4, e dos níveis séricos da Galectina-3, tendo como padrão a rigidez do fígado aferida por elastografia hepática (ARFI), em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B;
- avaliar o estágio da fibrose hepática através dos escores APRI e FIB-4 através do modelo ajustado pela análise de classe latente, em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B;
- correlacionar os níveis séricos de GAL-3 e os escores APRI e FIB-4, com a velocidade de onda acústica aferida pela elastografia ARFI em pacientes com infecção crônica pelo HBV;
- comparar os níveis séricos de GAL-3 e os escores APRI e FIB-4 em pacientes com infecção crônica pelo HBV, de acordo com a presença de fibrose hepática significativa, segundo a elastografia ARFI;
- determinar pontos de corte para os escores APRI, FIB-4 e GAL-3, na predição da fibrose hepática significativa de acordo com a elastografia ARFI em pacientes com infecção crônica pelo HBV;
- avaliar o desempenho dos escores APRI e FIB-4, na predição da fibrose hepática significativa, tendo como padrão a elastografia ARFI, ajustados pela análise de classes latentes.

6 METODOLOGIA E CASUÍSTICA

6.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo prospectivo transversal, iniciado em março de 2015 a dezembro de 2018, incluindo pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite B (HBV), atendidos no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com a finalidade de avaliar a presença de fibrose significativa.

O tamanho da amostra foi definido pela disponibilidade de pacientes durante o período do estudo.

6.2 POPULAÇÃO ALVO

Pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

6.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B atendidos no Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, no período de março de 2015 a dezembro de 2018.

6.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBsAg positivo por mais de 6 meses). Idade superior a 18 anos.

6.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes que tenham coinfeção, tais como HIV ou HCV
- Pacientes imunodeprimidos ou transplantados.
- Pacientes sob tratamento antiviral ou quimioterapia
- Pacientes com consumo de etanol (>210 g/semana para homens e 140 g/semana para mulheres),

6.6 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

6.6.1 Variáveis independentes

Tabela 1 - Tabela de categorização das variáveis independentes.

Variável	Definição	Escala de medidas
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e data de realização da coleta sanguínea (em anos).	Variável numérica discreta
Sexo	Quanto ao gênero	Variável categórica dicotômica: Masculino Feminino
AST	Quantificação sérica da aspartato aminotransferase pelo método enzimático	Variável numérica contínua: Níveis de AST U/L.
ALT	Quantificação sérica da alanina aminotransferase pelo método enzimático	Variável numérica contínua: Níveis de ALT U/L.
HBsAg	Quantificação sérica do antígeno de superfície do vírus da hepatite B pelo método de quimioluminescência.	Variável categórica dicotômica: Positivo/Negativo
HBeAg	Deteção sérica do antígeno e do vírus da hepatite B pelo método de quimioluminescência.	Variável categórica dicotômica: Positivo/Negativo
anti-HBe	Deteção sérica do anticorpo anti o antígeno e do vírus da hepatite B pelo método de quimioluminescência	Variável categórica dicotômica: Positivo/Negativo
HBV DNA	Quantificação do vírus da hepatite B através da técnica de qPCR.	Variável numérica contínua: IU/mL ou log
APRI	Ferramenta calculadora: AST para Índice de Proporção de Plaquetas (APRI) (AST / limite superior do normal * 100 / contagem de plaquetas).	Variável numérica contínua
FIB-4	A pontuação da Fibrose 4 (FIB-4) (Idade x AST) / (Plaquetas x((ALT) ^{1/2})	Variável numérica contínua
GAL-3	GAL-3 anti humana, conjugado com biotina/streptavidina, leitura da DO.	Variável numérica contínua (pg/mL)
INR	Razão internacional normalizada	Variável numérica contínua

6.6.2 Variável dependente

Tabela 2 - Tabela de categorização da variável dependente.

Variável	Definição	Escala de medidas
Elastografia hepática	quantificação da velocidade da onda de cisalhamento a qual é gerada pelo deslocamento do tecido e o é sinal convertido em valor quantitativo de rigidez do tecido e expresso em velocidade (m/s),	Variável numérica contínua (m/s)

6.7 OPERACIONALIZAÇÃO DO ESTUDO

Ao chegar ao ambulatório de hepatologia o paciente é submetido ao questionário para coleta de dados (APÊNDICE B) demográficos e clínicos. Paralelamente, o mesmo deverá permanecer 4 horas em jejum ao anteceder a elastografia ARFI, quando, prontamente, o paciente fez coleta sanguínea venosa, para realização de exames laboratoriais, pesagem e medição da altura, indo em seguida, submeter-se à elastografia hepática ARFI.

6.8 DETERMINAÇÃO DA ALT, AST, GGT, FOSFATASE ALCALINA

As amostras sorológicas foram quantificadas utilizando-se kits para automação da marca *Beckman Coulter*® em equipamento de automação au680® e metodologia enzimática conforme preconiza o fabricante, no setor de Bioquímica do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE.

6.9 HEMOGRAMA (PLAQUETAS)

A quantificação de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia *Pentra 120®* (*Horiba ABX Diagnostics*), metodologia por impedância conforme o fabricante.

6.10 INR

Quantificado através do analisador *ACL TOP 500®* (*Werfen company*), conforme o fabricante.

6.11 APRI

$\text{AST} / \text{limite superior do normal} \times 100 / \text{contagem de plaquetas}$.
(WAI et al., 2003); (MAO et al., 2016).

6.12 FIB-4

$(\text{Idade} \times \text{AST}) / (\text{Plaquetas} \times ((\text{ALT})^{1/2}))$
(STERLING et al., 2006); (WADHVA et al., 2018).

6.13 DETERMINAÇÃO DO HBSAG, HBEAG E ANTI-HBE

Para quantificação do HBsAg e determinação do HBeAg e anti-HBe foram utilizados kits da marca *Abbott®* em equipamento de automação *Architect®*, por metodologia enzimática conforme preconiza o fabricante.

6.14 QUANTIFICAÇÃO DO HBV DNA

A quantificação do HBV-DNA foi realizada utilizando o sistema de automação da plataforma *Roche Diagnostics®* (*COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan*) pela técnica PCR em tempo real quantitativa (qPCR), abrangendo uma faixa de quantificação de $1 - 9 \log_{10} (10 - 10^9 \text{ UI/mL})$.

6.15 QUANTIFICAÇÃO DA GAL-3

Os níveis séricos de GAL-3 foram determinados utilizando a técnica de enzima imunoensaio do tipo sandwich, no qual a microplaca marcada com anticorpo monoclonal anti GAL-3 humana, após a adição do conjugado com substrato, solução de parada e revelador, fará ligação diretamente proporcional à concentração de GAL-3 contida na amostra. Metodologia enzimática conforme preconiza o fabricante. *R&D Systems, Inc.* A densidade óptica foi lida com um espectrofotômetro para microplacas a 450 nm..

6.16 ELASTOGRAFIA HEPÁTICA (ARFI)

Ao anteceder a elastografia, o paciente estava 4 horas em jejum, quando a mesma foi realizada em sistema ultrassonográfico *Siemens Acuson S2000™* com (*Siemens Medical Solutions, Erlangen, Alemanha*), com o transdutor convexo 4C1 posicionado no hipocôndrio direito, entre o quinto e o sétimo espaço intercostal, para acesso do lobo hepático, com o paciente em decúbito dorsal, e o braço direito em abdução máxima. A região de interesse escolhida foi entre 2 e 3 cm abaixo da cápsula hepática, evitando-se vasos ou tecidos fibrosos. O resultado foi considerado válido após realizadas 10 medidas em discreta apnéia respiratória em cada paciente com variação interquartil menor que 30% da mediana, e número de medidas válidas acima de 80% do total de medidas realizadas. A velocidade de onda de cisalhamento foi expressa em m/s.

6.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de frequência entre os grupos, utilizou-se o teste do qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher*. A comparação entre as médias das variáveis com distribuição normal foi realizada através do teste *t* não pareado, e a comparação entre as medianas das variáveis não paramétricas, através do teste de *Mann-Whitney*. Para avaliar as correlações com a elastografia foram utilizados os testes de correlação linear de *Pearson* e o de *Spearman*.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de *p* menor que 0,05.

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS Statistics, versão 25 para Windows (*IBM Corporation*, Armonk, NY, EUA) e o software *MedCalc 15.2* (*MedCalc Software*, Mariakerke, Bélgica). A análise descritiva incluindo frequência, distribuição, mediana e intervalo interquartil foi realizada em ambos os grupos de fibrose significativa ($\geq F2$) e fibrose leve ($< F2$), e o teste de D'Agostino e Pearson foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. Uma análise univariada com χ^2 -teste foi usada para comparar variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney foi usado para comparar dois grupos independentes de variáveis contínuas.

O desempenho dos Scores APRI e FIB-4 foi avaliado com curvas ROC (*receiver operating characteristic*). Valores ótimos de ponto de corte para prever fibrose significativa com melhor sensibilidade e especificidade foram determinados e a razão de verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-) foram calculadas para esses valores de corte. A área sob a curva (AUC) foi usada para representar a precisão das previsões.

Na análise de classes latentes os fenômenos não observados (variáveis latentes) são investigados através de uma abordagem utilizando variáveis observadas. Onde as combinações dos eventos de ser positivo/negativo para cada variável observada do estudo em cada um dos indivíduos irão determinar as probabilidades do indivíduo de ser classificado como positivo ou negativo na variável latente. No presente estudo serão $3^2 = 9$ combinações, sendo as variáveis observadas utilizadas para construir a variável latente que representasse o padrão ouro no estudo o APRI, ARFI e FIB-4. Foram utilizados os pontos de corte referente aos valores definidos na literatura científica (FIB-4 = 1,33; APRI = 0,33 e ARFI = 1,59) para construir as variáveis categóricas (observadas) assumindo como positivos os valores $>$ ao ponto de corte e negativos os valores $\leq$ ao ponto de corte estabelecido. Criou-se uma variável latente onde os indivíduos foram classificados como positivos/negativos. Em seguida realizou-se uma análise de curva ROC onde foram determinadas as sensibilidades, especificidades, Intervalo de Confiança 95%, LR^+ e LR^- para cada uma das variáveis. Com o valor do ponto de corte obtido na curva ROC utilizando a classe latente como padrão criou-se a variável $ARFI_{CutOff\ CL}$ em positivo/negativo. Desta forma, também se analisou as curvas ROC para FIB-4 e APRI utilizando-se o $ARFI_{CutOff\ CL}$ como padrão ouro.

6.18 RISCOS

Desconforto de fazer uma coleta sanguínea venosa, que se dá pela inserção da agulha em veia periférica e flebite, que será minimizado pelo fato da coleta ser realizada por profissionais devidamente habilitados.

6.19 BENEFÍCIOS

A avaliação do grau de fibrose, através do uso da elastografia hepática, associada a quantificação da GAL-3 funciona como ferramenta não invasiva, de risco praticamente inexistente, trazendo maior rapidez ao diagnóstico. Caso o paciente seja diagnosticado como fibrose avançada poderá ser beneficiado com o tratamento para sua doença.

6.20 DESFECHOS

Os resultados de cada paciente serão disponibilizados para os mesmos, como também para o corpo médico para avaliação prognóstica e definição da conduta terapêutica.

6.21 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi iniciada com a submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-UFPE) em 04.03.2015, conforme parecer consubstanciado por esse comitê nº 964.965. (ANEXOS A e B), segue com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) de acordo com a Resolução 4662, conforme anexado à Plataforma Brasil, no item: Documentos Postados do Projeto.

Os pacientes foram informados da finalidade do estudo e após todos os esclarecimentos necessários, e para sua inclusão no estudo, assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Vale salientar que foi informado aos mesmos que a não concordância em participar do estudo, em nada interferirá em seu acompanhamento no ambulatório de Hepatologia.

O pesquisador foi autorizado a consultar os prontuários dos pacientes no SAME, quando necessário, com a finalidade de complementação da ficha clínica com dados referentes aos mesmos (ANEXO C).

7 RESULTADOS

7.1 ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA ATRAVÉS DA ELASTOGRAFIA, BIOMARCADORES SÉRICOS E ANÁLISE DE CLASSE LATENTE NA HEPATITE B CRÔNICA

Resumo

Justificativa e objetivo: O estadiamento da fibrose hepática é fundamental na avaliação prognóstica e definição terapêutica dos pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV). **Objetivo:** Avaliar a fibrose hepática através dos índices APRI e FIB-4, tendo como padrão a rigidez do fígado através da elastografia (ARFI), e através da análise de classe latente (ACL) em pacientes com infecção crônica pelo HBV. **Método:** pacientes com infecção crônica pelo HBV realizaram elastografia hepática (ARFI) e foram divididos em dois grupos conforme o grau: fibrose leve ($< F2$) ou significativa ($\geq F2$), admitindo-se o ponto de corte 1,21 m/s. Em seguida o desempenho dos índices-APRI e FIB-4 foi avaliado através de curva ROC. Utilizando as avaliações da fibrose por estes três métodos foi construído também um modelo matemático combinado, através da ACL, admitindo-se a ausência de um exame padrão-ouro para a fibrose na hepatite crônica pelo HBV. **Resultados:** Foram incluídos neste estudo 109 pacientes, sendo 61 masculinos, com média de idade de 43 anos. De acordo com a separação pela elastografia em dois grupos: fibrose significativa = 38 (34,86%) pacientes e não significativa = 71 (65,13%) pacientes. Através da curva ROC foi identificado ponto de corte para o APRI = 0,37 com sens = 63% e espec = 63%, AUC = 0,661; e para o FIB-4 = 1,59 com sens = 47% e espec = 87%, AUC = 0,676 Através da curva ROC construída pela ACL foi identificado ponto de corte para o APRI = 0,33, com sens = 69% e espec = 93%; AUC = 0,83 e para o FIB-4 = 1,33, com sens = 100% e espec = 96%, AUC = 0,93. **Conclusão:** neste estudo, tendo como padrão a fibrose hepática aferida pela elastografia (ARFI), verificou-se modesta acurácia do APRI e do FIB-4. Já através da Análise de Classe Latente, verificou-se que o índice FIB-4 obteve ótimo desempenho, apresentou grande acurácia e seria capaz de evitar a biópsia em grande parte dos casos na identificação de pacientes com fibrose significativa decorrente da infecção crônica pelo vírus da hepatite B. Futuros estudos com maior

número de pacientes e utilizando a biópsia hepática como padrão-ouro serão necessários.

Palavras chave: Técnica de Imagem por elasticidade, Hepatite B crônica, Cirrose hepática, Modelos teóricos, Curva ROC.

Introdução

O diagnóstico e a decisão para o tratamento das doenças crônicas do fígado dependem sobremaneira da intensidade da fibrose hepática, fazendo com que a aferição do grau da fibrose seja de grande importância. Com efeito, não é difícil diagnosticar a doença avançada no fígado através do quadro clínico/laboratorial ou da ultrassonografia abdominal, todavia se torna mais dificultoso avaliar estágios menos avançados de fibrose. Embora a biópsia hepática seja considerada o “padrão ouro” para avaliação da fibrose no fígado; trata-se de procedimento invasivo e com complicações às vezes graves. Além disso, por avaliar diminuto fragmento do parênquima hepático, podem ocorrer erros de amostragem. (QI et al., 2018) (CHENG-HAN LEE et al., 2017) (CHOI et al., 2014). Em virtude destas desvantagens da biópsia, marcadores não invasivos de fibrose vêm sendo desenvolvidos e podem ser divididos em séricos e de imagem.

Atualmente, dispõe-se de marcadores para predição do grau de fibrose que empregam medidas laboratoriais de rotina, como os níveis séricos de aminotransferases, tempo de protrombina e contagem de plaquetas, como também outros que utilizam estas dosagens em conjunto. Entre estes últimos, encontram-se o Fibrosis 4 index (FIB-4), inicialmente desenvolvido para doença hepática crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), mas recentemente vem sendo utilizado para outras enfermidades hepáticas, e envolve: idade, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e contagem de plaquetas (PLT). Da mesma forma, também se dispõe do Aspartato aminotransferase Platelet Ratio Index (APRI) proposto por (WAI et al., 2003) para aferir fibrose e cirrose pelo HCV. Contudo, já se encontram estudos que avaliam seu desempenho também em pacientes com infecção crônica pelo HBV. (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017), (XIAO; YANG; YAN, 2015), (LI et al., 2017a).

Os principais métodos de imagem para avaliação da fibrose hepática incluem a elastografia transitória (FibroScan®), a elastografia com ultrassonografia ou por ressonância magnética (RNM), que estão se disseminando como as modalidades de escolha para aferir a fibrose hepática. (CARDOSO; FIGUEIREDO-MENDES; CARVALHO-FILHO, 2012), (SRINIVASA BABU et al., 2016).

A elastografia por ondas acústicas (*Acoustic radiation force impulse - ARFI*) constitui técnica de imagem que se baseia na excitação mecânica do tecido, utilizando pulsos acústicos de curta duração (pulsos de pressão) na região de interesse escolhida pelo operador (ROI) (ZENG et al., 2016). Esses pulsos produzem ondas de cisalhamento que se espalham sobre a região de interesse, perpendicularmente ao pulso de pressão acústico, gerando ondas localizadas (CHOI et al., 2014). A elastografia, no entanto, tem limitações, como falhas de mensuração e resultados não interpretáveis que ocorrem em 5 e 15% dos casos, sendo o principal fator limitante a obesidade, seguindo-se a ascite e espaços intercostais estreitos. (CASSINOTTO et al., 2013).

Contudo, a maioria dos estudos com marcadores séricos e de imagem para avaliar o grau de fibrose hepática envolveram pacientes com hepatite crônica pelo HCV e ainda são poucos os dados sobre a acurácia destes métodos na avaliação da fibrose induzida pelo HBV. Contudo, foi observado que os valores da rigidez hepática avaliados pelo ARFI e elastografia, em relação aos estágios de fibrose da biópsia hepática, foram semelhantes tanto para HCV como para HBV (SPOREA et al., 2012). De fato, este avanço na avaliação da fibrose pelo HCV com métodos não invasivos reduziu em muito a indicação de biópsia hepática para estes pacientes, dificultando indiretamente a indicação da biópsia também para os pacientes com hepatite pelo HBV.

A não realização da biópsia faz com que na prática clínica muitas vezes não se disponha de um padrão-ouro para avaliar o grau de fibrose em pacientes com infecção crônica pelo HBV.

Nestas situações, vem-se empregando modelos matemáticos para variáveis que não são diretamente observáveis, as quais são denominadas variáveis latentes, e são empregadas quando não se dispõe de padrão-ouro (MASTELLA et al., 2015).

Análise de Classes Latentes (ACL) é um método estatístico que identifica distintos grupos (classes latentes) baseados nos padrões de respostas observadas em variáveis categóricas. Esse método investiga se a relação da covariância entre

um grupo de variáveis observáveis é explicada por outra variável latente (classe). (LEÃO et al., 2017). O objetivo dessa análise é identificar subgrupos mutuamente exclusivos de indivíduos, com base em um conjunto de variáveis categóricas observadas, sabidamente relacionadas à variável latente de interesse. (MASTELLA et al., 2015). Nesta metodologia, um padrão de referência é construído com base na combinação de resultados de testes observados e estimados de cada paciente. (FERNANDES et al., 2017).

Em virtude da escassez de dados utilizando métodos não invasivos e das dificuldades para se obter a biópsia do fígado como padrão-ouro para avaliar a fibrose, este estudo tem como objetivo avaliar a fibrose hepática através dos índices APRI e FIB-4, tendo como padrão a rigidez do fígado através da elastografia (ARFI), e através da análise de classe latente (ACL) em pacientes com infecção crônica pelo HBV.

Pacientes e Método

Trata-se de estudo prospectivo, transversal, realizado nos ambulatórios de Hepatologia, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de PE, no período de março de 2015 a dezembro 2018, em que foram incluídos pacientes com infecção crônica pelo HBV de forma consecutiva e por demanda espontânea. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, de acordo com a resolução 466/2012 com aprovação em. 04.03.2015, nº 964.965.

Pacientes com infecção crônica pelo HBV (HBsAg positivo por mais de 6 meses), de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos e que concordaram em participar da pesquisa, após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram incluídos.

Foram excluídos pacientes que estavam sob tratamento antiviral, com coinfeção pelo HIV ou HCV, com consumo de etanol acima de 210 g/semana para homens e 140 g/semana para mulheres, imunodeprimidos ou transplantados (WALSH,K; ALEXANDER, G. 2000).

Antes da elastografia, após jejum de 4 horas, foi realizada avaliação clínica e foram coletados 10 mL de sangue venoso para realização de hemograma, ALT, AST, plaquetas, fosfatase alcalina, GGT, INR e quantificação do HBV DNA.

Para as dosagens de ALT, AST, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase, as amostras sorológicas foram quantificadas utilizando-se kits para automação da marca *Beckman Coulter®* em equipamento de automação au680® e metodologia enzimática conforme preconiza o fabricante.

A quantificação de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia *Pentra 120® (Horiba ABX Diagnostics)*, metodologia por impedância conforme o fabricante.

O INR foi quantificado através do analisador *ACL TOP 500® (Werfen company)*, conforme o fabricante.

O índice APRI foi calculado segundo a fórmula: (AST/limite superior do normal) x 100/ contagem de plaquetas (WAI et al., 2003).

O índice FIB-4 foi calculado segundo a fórmula: (idade x AST)/ (plaquetas x $\sqrt{\text{ALT}}$) (YIN et al., 2017), (STERLING et al., 2006).

Para determinação do HBsAg, do HBeAg e anti-HBe, foram utilizados kits da marca *Abbott®* em equipamento de automação *Architect®*, por metodologia enzimática conforme preconiza o fabricante.

A quantificação do HBV-DNA foi realizada utilizando o sistema de automação da plataforma *Roche Diagnostics® (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan)* pela técnica PCR em tempo real quantitativa (*qPCR*), abrangendo uma faixa de quantificação de 1 – 9 log₁₀ (10 – 109 UI/mL), conforme o fabricante.

Logo após a coleta sanguínea, foi realizada elastografia *ARFI* utilizando-se aparelho ultrassonográfico *Siemens Acuson S2000™*, com o transdutor convexo 4C1 posicionado no hipocôndrio direito, entre o quinto e o sétimo espaço intercostal, para acesso do lobo hepático, com o paciente em decúbito dorsal, e o braço direito em abdução máxima. A região de interesse escolhida foi entre 2 e 3 cm abaixo da cápsula hepática, evitando-se vasos ou tecidos fibrosos. O resultado foi considerado válido após realizadas 10 medidas em apnéia expiratória em cada paciente com variação interquartil menor que 30% da mediana, e número de medidas válidas acima de 80% do total de medidas realizadas. A velocidade de onda de cisalhamento foi expressa em m/s. Adotou-se 1,21 m/s como ponto de corte, que vindo sendo utilizado na rotina do nosso serviço há alguns anos, conforme descrito nos estudos de (SPOREA et al., 2011), (SPOREA et al., 2012) para separar os pacientes com fibrose significativa ($\geq$ F2), visto que, segundo estudo de SPOREA et al., (2012). os valores da rigidez hepática avaliados pelo ARFI e elastografia, em

relação aos estágios de fibrose da biopsia hepática, foram semelhantes tanto para HCV como para HBV .

Método estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando o software *SPSS Statistics*, versão 25 para Windows (*IBM Corporation*, Amonk, NY, EUA,) e o software *MedCalc 15.2* (*MedCalc Software*, Mariakerke, Bélgica). A análise descritiva incluindo frequência, distribuição, mediana e intervalo interquartil foi realizada em ambos os grupos, e o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados.

A análise descritiva incluindo frequência, distribuição, mediana e intervalo interquartil foi realizada em ambos os grupos, e o teste de *Pearson* foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. Uma análise uni variada com χ^2 -test foi usada para comparar variáveis categóricas e o teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparar dois grupos independentes de variáveis contínuas. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O desempenho dos índices APRI e FIB-4 foi avaliado com curvas *ROC* (*receiver operating characteristic*). Valores de ponto de corte para predizer fibrose significativa com melhor sensibilidade e especificidade, foram determinados e a razão de verossimilhança positiva e negativa também foram calculadas. A área sob a curva (AUC) foi usada para representar a precisão das previsões.

Na análise de classes latentes os fenômenos não observados (variáveis latentes) são investigados através de uma abordagem utilizando variáveis observadas. Onde as combinações dos eventos de ser positivo/negativo para cada variável observada do estudo em cada um dos indivíduos irão determinar as probabilidades do indivíduo de ser classificado como positivo ou negativo na variável latente. No presente estudo foram $3^2 = 9$ combinações, sendo as variáveis observadas utilizadas para construir a variável latente que representou o padrão ouro no estudo o APRI, ARFI e FIB-4. Utilizou-se os pontos de corte referentes aos valores definidos em um mesmo estudo, envolvendo pacientes com infecção crônica pelo HBV. Para construir as variáveis categóricas (observadas) foi assumido como positivos os valores $>$ ao ponto de corte e negativos os valores $\leq$ ao ponto de corte (FIB-4 = 1,33; APRI = 0,33 e ARFI = 1,59) estabelecido no artigo de (LI et al.,

2017a). Criou-se uma variável latente onde os indivíduos foram classificados como positivos/negativos. Em seguida realizou-se uma análise de curva ROC onde foram determinadas as sensibilidades, especificidades, Intervalo de Confiança 95%, LR^+ e LR^- para cada uma das variáveis.

Com o valor do ponto de corte para o ARFI obtido na curva ROC utilizando a ACL, criou-se a variável ARFI (Cutoff-ACL) em positivo/negativo. Desta forma, também se analisou as curvas ROC para FIB-4 e APRI, utilizando-se o ARFI (Cutoff-ACL) para comparar com o ponto de corte descrito na literatura.

Resultados

Foram incluídos neste estudo 109 pacientes com infecção crônica pelo HBV, cujos dados demográficos e laboratoriais estão descritos na Tabela 1.

Em relação aos fatores de risco para infecção pelo HBV, foi identificado que a relação sexual sem preservativo e a exposição prévia a cirurgias, foram as variáveis que alcançaram as maiores frequências 42 (38,5%) e 40 (36,7%), respectivamente. Entre os 109 pacientes, 11 (10,1%) também apresentavam doença hepática gordurosa à ultrassonografia.

A mediana da velocidade, através da elastografia (SWS), dos 109 pacientes foi 1,10 m/s (0,94-1,26) e mediana de IQR 0,12 m/s (0,08-0,18). De acordo com o ponto-de-corte de 1,21 m/s (SPOREA et al., 2011),(SPOREA et al., 2012), 38 pacientes foram classificados como tendo fibrose significativa ($\geq F2$) e 71 como fibrose leve ($< F2$), conforme a classificação METAVIR. A mediana da rigidez hepática no grupo de pacientes com fibrose significativa foi: 1,32 m/s (1,25 – 1,54) e no grupo com fibrose leve foi: 1,00 m/s (0,87 - 1,10) ($p < 0,001$). Entre os 38 com fibrose significativa, 30 foram classificados como F2, 1 como F3 e 7 como F4.

Tabela 1 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019.

Características	N = 109	pacientes
Sexo (n,%)		
Masculino	61	(56,0)%
Feminino	48	(44,0)%
Idade (anos)*	43	(34,5-54)
IMC (kg/m ²)*	26,7	(24,4-29,5)
AST (/LSN)*	0,72	(0,63-0,97)
ALT (/LSN)*	0,90	(0,64-1,19)
GGT (/LSN)*	0,64	(0,48-1,00)
Fosfatase alcalina (U/L)*	174,8	(133,6-221,7)
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)*	209	(171-248)
INR*	1,05	(1,01-1,09)
Anti-HBe (n, %)	96	(88,1)
HBV-DNA (log ₁₀ UI/mL)*	2,40	(1,62-3,40)
APRI*	0,36	(0,27-0,50)
FIB-4*	0,98	(0,69-1,59)

*Mediana (P₂₅-P₇₅). Distribuição não normal (Teste de normalidade *Shapiro-Wilk* <0,05)

A Tabela 2 descreve a distribuição dos pacientes nos dois grupos de fibrose, comparando as variáveis analisadas neste estudo. Verifica-se que variáveis: gênero masculino, IMC, plaquetas, INR, anti-HBe, HBV DNA, APRI e FIB-4 apresentaram diferenças entre os dois grupos.

De acordo com esta divisão em dois grupos, fibrose leve ou significativa, foram construídas curvas ROC e calculadas as acurácias do APRI e do FIB-4, tendo o ARFI como padrão-ouro (Figura 1 e Tabela 3, respectivamente).

A área sob a curva (AUC) do APRI foi 0,661 e o melhor ponto de corte seria 0,37, observando-se 69 (63%) dos 109 pacientes verdadeiros positivos e negativos.

A área sob a curva (AUC) do FIB-4 foi 0,676 e o melhor ponto de corte seria 1,59, observando-se 80 (73%) dos 109 pacientes verdadeiros positivos ou negativos.

Tabela 2 – Características demográficas e clínico-laboratoriais de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B de acordo com o grau de fibrose hepática aferida pela elastografia ARFI, Recife, 2019.

Características	ARFI				p*
	Fibrose significativa (≥ F2)		Fibrose leve (< F2)		
N	38	(34,86%)	71	(65,13%)	
Sexo (n, %)					
Masculino	29	(76,3)	32	(45,1)	0,002 ^a
Feminino	9	(23,7)	39	(54,9)	
Idade (anos)*	43,5	(36,8-58,2)	42	(33-54)	0,186 ^b
IMC (kg/m ²)*	25,3	(22,0-29,0)	28,1	(25,0-31,2)	0,012 ^b
AST (/LSN)*	0,83	(0,63-1,21)	0,72	(0,62-0,88)	0,084 ^b
ALT (/LSN)*	0,97	(0,63-1,37)	0,88	(0,67-1,14)	0,447 ^b
GGT (/LSN)*	0,82	(0,47-1,33)	0,62	(0,49-0,85)	0,143 ^b
Fosfatase alcalina (U/L)*	170,0	(145,4-223,0)	178,7	(128,2-219,5)	0,573 ^b
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)*	182	(140-236)	217	(187-251)	0,004 ^b
INR*	1,08	(1,04-1,10)	1,04	(1,00-1,08)	0,012 ^b
Anti-HBe (n, %)	28	(75,7)	68	(95,8)	0,003 ^c
HBV-DNA (log ₁₀ UI/mL)*	2,02	(1,48-2,95)	2,96	(1,84-3,52)	0,023 ^b
APRI*	0,40	(0,32-0,77)	0,35	(0,26-0,42)	0,006 ^b
FIB-4*	1,36	(0,82-1,88)	0,91	(0,64-1,35)	0,003 ^b

*Mediana (P₂₅-P₇₅). ^aTeste do qui-quadrado; ^bTeste de Mann-Whitney; ^cTeste Exato de Fisher.

Os pontos de corte da literatura: APRI = 0,33; FIB-4 = 1,33; ARFI = 1,59 (FERNANDES et al., 2017) (LI et al., 2017b) que foram inicialmente utilizados, após a análise de classe latente, admitindo-se a ausência de padrão-ouro, foram “ajustados” para 0,45; 1,31 e 1,26, como os melhores pontos de cortes para o APRI, FIB-4 e ARFI respectivamente, conforme descrito na Tabela 4.

De acordo com os dados da Tabela 4, após a análise de classe latente, verifica-se que o FIB-4 constitui o marcador sérico com maior acurácia na identificação de pacientes com fibrose leve ou significativa.

Figura 1 – Curvas ROC (*receiver operator characteristic curve*) representando o desempenho das variáveis APRI e FIB-4 na avaliação da fibrose hepática, tendo como padrão a elastografia ARFI de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite; Recife, 2019.

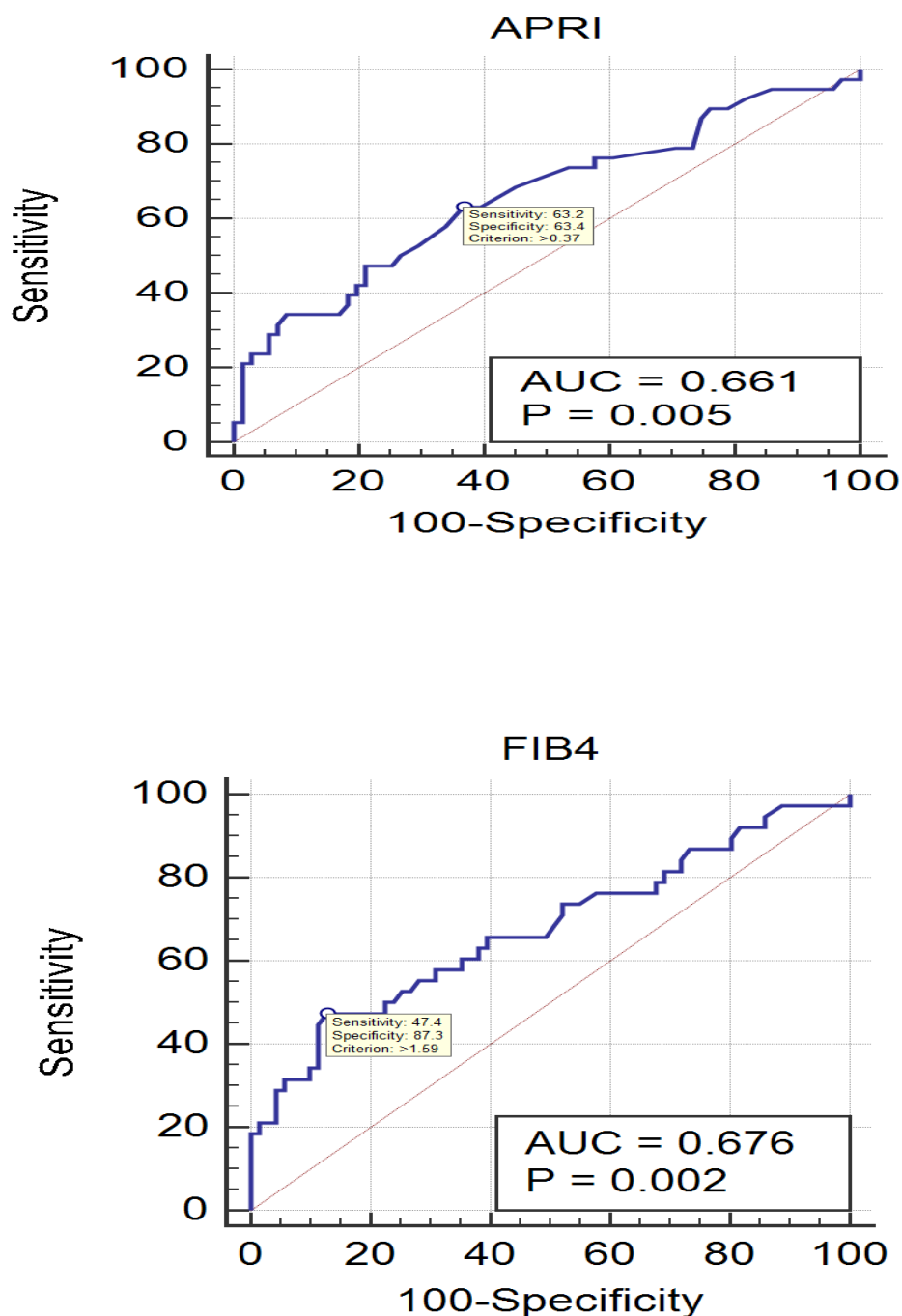


Tabela 3 – Desempenho dos pontos de corte obtidos pela curva ROC para avaliação da fibrose leve ou significativa com as variáveis APRI e FIB-4, tendo o ARFI como padrão-ouro (1,21 m/s), em 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.

	pSWE		<i>p</i>	Sensibilidade		Especificidade		LR+	LR-	A
	F≥2	F<2		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}			
APRI										
>0,37	24	26	0,0084^a	63,16	46,0-78,2	63,38	51,1-74,5	1,72	0,58	63,30
≤0,37	14	45								

^aTeste do qui-quadrado. A: Acurácia; LR+: Razão de verossimilhança positiva; LR-: Razão de verossimilhança negativa; ; * *point shear wave elastography* (elastografia por onda de cisalhamento pontual).

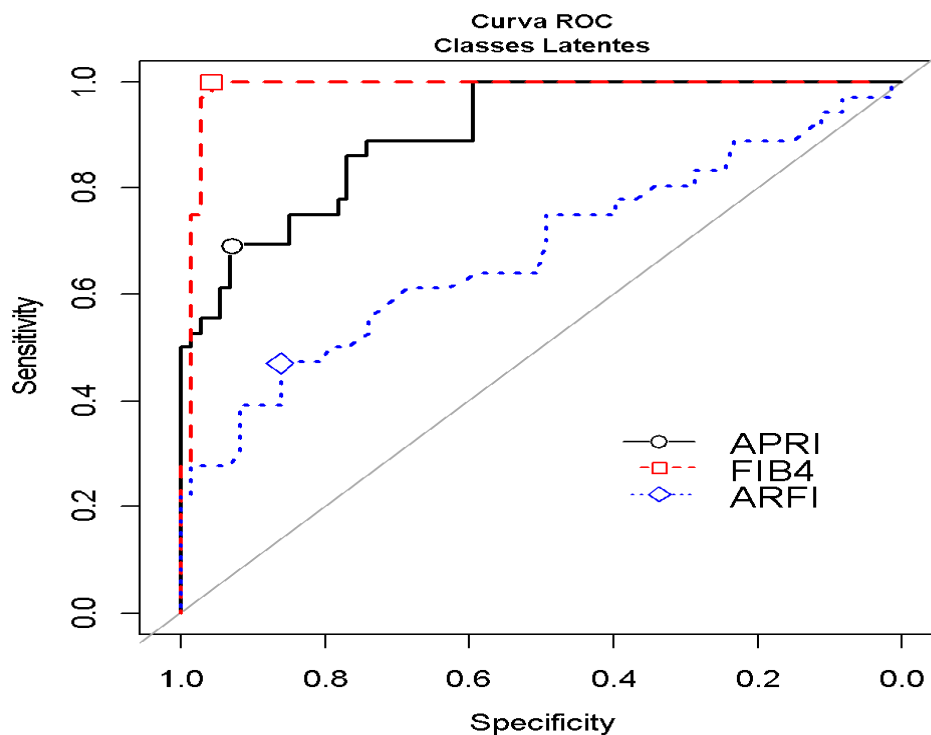
	pSWE*		<i>p</i> *	Sensibilidade		Especificidade		LR+	LR-	A
	F≥2	F<2		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}			
FIB-4										
>1,59	18	9	0,0001	47,37	31,0-64,2	87,32	77,3-94,0	3,74	0,60	73,39
≤1,59	20	62								

^aTeste do qui-quadrado. A: Acurácia; LR+: Razão de verossimilhança positiva; LR-: Razão de verossimilhança negativa; * *point shear wave elastography* (elastografia por onda de cisalhamento pontual).

Tabela 4 – Desempenho do APRI, FIB-4 e ARFI na predição da fibrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HBV, ajustada pela análise de classes latentes.

CutOff	Método	Classe Latente (CL)				Sensibilidade		Especificidade		LR+	LR-	A (%)
			F2-F4	F0-F1	(COConCL)	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%			
	APRI (Literatura)	+	-									
0,33	F2-F4	+	36	33	0,45							
	F0-F1	-	0	41		69,44	(51,9 - 83,6	93,24	(84,9 - 97,7)	10,28	0,33	70
	FIB-4											
1,33	F2-F4	+	36	3	1,31							
	F0-F1	-	0	71		100	(90,2 - 100,	95,95	(88,6 - 99,1)	24,67	0	98,16
	ARFI											
1,59	F2-F4	+	8	0	1,26							
	F0-F1	-	28	73		47,22	(30,4 - 64,5	86,3	(76,2 - 93,2)	3,45	0,61	74,31

Figura 2 - Curvas ROC (*receiver operator characteristic curve*) representando o desempenho das variáveis APRI, FIB-4 e ARFI na avaliação da fibrose hepática, de acordo com a análise de classe latente, em 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.



Na Tabela 5 observam-se as probabilidades calculadas pela análise de classe latente, identificando-se na primeira linha, os verdadeiramente negativos (37) e na última os verdadeiramente positivos (8), visto terem sido concordantes nos três métodos. Isto se traduz na definição do grau de fibrose em 45 (41%) dos 109 pacientes, sem a necessidade de realização de biópsia hepática. As demais linhas mostram as probabilidades da variável dicotômica, ou seja, positivo (F2-F4) ou negativo (F0-F1), com suas respectivas frequências de acordo com cada método não-invasivo de avaliação da fibrose.

Tabela 5 – Tabela representativa das probabilidades calculadas pela análise de classe latente para as variáveis APRI, FIB-4 e ARFI dos 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.

				neg	pos	estimado
nAPRI	nFIB4	nARFI	Freq	Class 1	Class 2	n
0	0	0	37	1,000	0,000	38
0	1	0	3	0,997	0,003	3
1	0	0	33	1,000	0,000	33
1	1	0	28	0,095	0,905	28
1	1	1	8	0,000	1,000	8
Total			109			110

Após o ajuste do modelo, através da análise de classe latente, com a identificação de novo ponto de corte (1,26 m/s) para o ARFI, foi construída nova curva e calculadas a acurácia do APRI e do FIB-4, para comparação com os dados empregando-se o ponto de corte da literatura (1,21 m/s).

Figura 3 – Curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) representando o desempenho das variáveis APRI e FIB-4 aferida pela elastografia ARFI com ponto de corte 1,26, dos 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B de acordo com o grau de fibrose hepática; Recife, 2019.

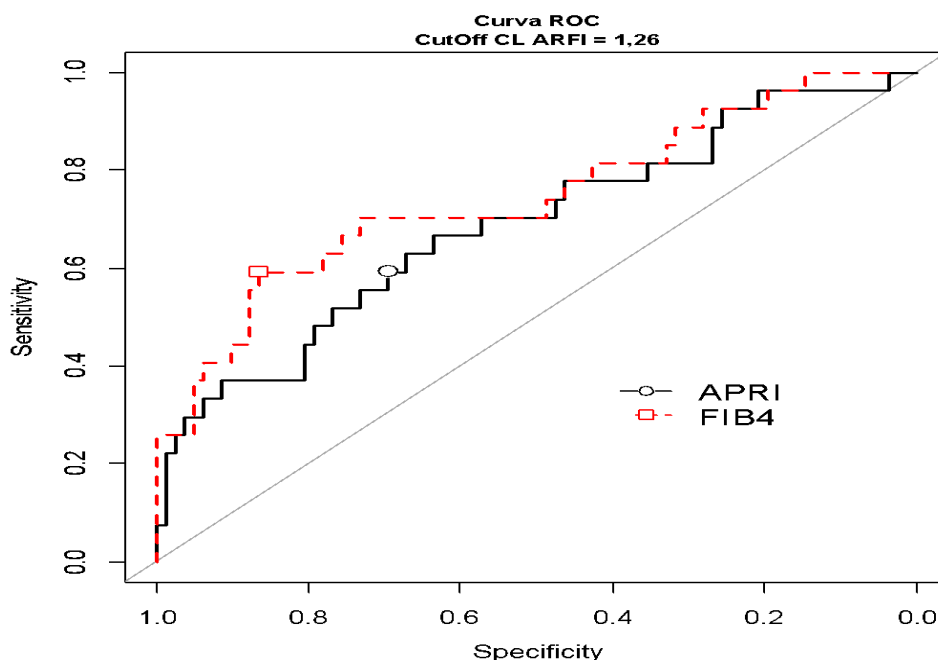


Tabela 6 – Desempenho dos pontos de corte obtidos pela curva ROC para avaliação da fibrose leve ou significativa com as variáveis APRI e FIB-4, tendo o ARFI como padrão-ouro (1,26 m/s), de 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.

CutOff	Método	ARFI = 1,26 (CL) (COConARFI)				Sensibilidade	Especificidade				+LR	-LR	A(%)
		F2-F4		F0-F1			Valor		IC 95%	Valor			
Literatura													
	APRI		+	-									
0,33	F2-F4	+	21	48	0,39								
	F0-F1	-	6	34		59,26	38,8 - 77,6	69,51	(58,4 - 79,2)	1,94	0,59	50,46	
	FIB-4												
1,33	F2-F4	+	18	21	1,59								
	F0-F1	-	9	61		59,26	38,8 - 77,6	86,59	(77,3 - 93,1)	4,42	0,47	72,48	

Comparando o ponto de corte ajustado pela ACL (1,26 m/s) com o ponto de corte da literatura (1,21 m/s), tendo o ARFI como padrão-ouro, verificam-se poucas mudanças (Tabelas 3 e 6). Com o ajuste, observa-se discreta redução da sensibilidade e aumento da especificidade para o APRI e aumento da sensibilidade para o FIB-4. Contudo, observa-se aumento dos casos falso-positivos para o APRI.

Ao se avaliar as acurácias APRI, FIB-4, tendo o ARFI como padrão ouro, com ponto de corte da literatura (1,21) e o ponto de corte obtido após o ajuste do modelo através da análise de classe latente, observa-se diminuição da acurácia para ambos os testes (Tabelas 4 e 6).

Discussão

Recentemente, métodos não invasivos baseados na elastografia ou em testes sorológicos têm sido utilizados para avaliar a fibrose hepática (TAI et al., 2015). O uso de elastografia para avaliação da fibrose hepática vem sendo recomendado como modalidade de primeira linha para avaliação da hepatite crônica pelo HBV, deixando a biópsia hepática reservada para casos indeterminados (SPOREA et al., 2011), (LI et al., 2017a). Além disso, a avaliação indireta da atividade inflamatória no fígado através dos níveis séricos das aminotransferases, acrescidos da quantificação da carga viral e dos marcadores sorológicos do HBV são consideradas ferramentas adequadas segundo as recentes atualizações das diretrizes nacionais e internacionais de prática clínica. (GILL et al., 2018), (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 2017).

As diretrizes atuais não recomendam rotineiramente a biópsia hepática em portadores inativos do HBV. No entanto, alguns podem ter fibrose hepática significativa e outros podem desenvolver fibrose durante o seguimento. Apesar de algumas limitações, a elastografia transitória parece ser uma abordagem ideal para identificar esses pacientes e para monitorar repetidamente ao longo do tempo as alterações hepáticas nos portadores inativos (PITA et al., 2014). De fato, meta-análise, envolvendo 7.808 pacientes, revelou que a elastografia transitória pode constituir ferramenta confiável na detecção de fibrose hepática em pacientes com hepatite crônica pelo HBV (QI et al., 2018).

De acordo com estes resultados, a elastografia hepática passou a ser recomendada pela Associação Americana para o Estudo das Doenças Hepáticas

(AASLD) e pela Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) para avaliação da fibrose no fígado. (TERRAULT et al., 2018) (LAMPERTICO et al., 2017).

Em nosso estudo, envolvendo 109 pacientes com infecção crônica pelo HBV, verifica-se de acordo com o resultado do ARFI que a maioria dos pacientes apresentava fibrose leve ($< F2$), o que deve ser decorrente dos critérios de exclusão que adotamos, em particular, o uso de antivirais contra o HBV. Assim, a amostra foi composta basicamente por pacientes com doença pelo HBV menos avançada e virgens de tratamento. Lembrem-se que, de acordo com o PCDT do Ministério da Saúde do Brasil, para receberem terapia antiviral, os pacientes devem apresentar alanina aminotransferase ≥ 2 vezes o LSN, independentemente do HBeAg, ou fibrose significativa ($\geq F2$) na biópsia ou na elastografia (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 2017).

De fato, a divisão em dois grupos de acordo com o grau de fibrose leve e significativa, estabelecida pelo ARFI, foi confirmada pelos dados demográficos e pelos achados laboratoriais. Entre os pacientes com fibrose significativa verificou-se predominância do sexo masculino. De fato, WU et al., (2018) em estudo envolvendo 533 pacientes com infecção crônica pelo HBV que realizaram elastografia transitória, verificaram que o sexo masculino constitui fator preditivo de piora da fibrose hepática. Sugeriram que níveis mais elevados de testosterona estejam associados à maior agressão hepática (WU et al, 2018).

Em nossa casuística também se verifica que os níveis séricos de GGT foram mais elevados, o INR foi mais alargado e o número de plaquetas foi menor naqueles pacientes com fibrose significativa. Na prática clínica, estes achados laboratoriais são mais encontrados em pacientes com doença hepática mais avançada e confirmam a intervenção realizada pelo ARFI, separando os pacientes em dois grupos de acordo com grau de fibrose.

Verificou-se ainda que os nossos 38 pacientes com fibrose significativa apresentavam menores níveis séricos de HBV-DNA. Por outro lado, (ABDO et al., 2014) avaliaram 97 pacientes com HBV DNA < 2.000 IU/mL e observaram que 19 (19,6%) apresentavam fibrose significativa ($\geq F2$). Já entre 116 pacientes com HBV DNA entre 2.000 e 20.000 IU/mL, 21 (18,1%) também apresentavam fibrose significativa ($\geq F2$). Concluíram que a taxa de ocorrência de fibrose significativa é semelhante ($p = 0,85$) tanto naqueles com HBV-DNA < 2.000 IU/mL como naqueles

com níveis entre 2.000 e 20.000 IU/mL. Estes autores sugeriram que a ocorrência de fibrose significativa em cerca de 20% dos pacientes com baixa viremia, ou portadores inativos do HBV, poderia ser decorrente do curso ondulante da doença. Assim, poderia ocorrer à agressão ao hepatócito e consequentemente fibrose durante as fases ativas e, posteriormente, ocorreria a transição para a fase de portador inativo.

Estudo realizado por (OLIVEIRA et al., 2016) com 37 pacientes com carga viral < 2,000 UI/mL e anti-HBe reagente, com diagnóstico prévio de portadores inativos, revelou que 11 (40,7%) apresentavam fibrose hepática avançada e, destes, 2 (7,4%) apresentavam cirrose e transaminases normais. Concluíram que o fato de ser portador inativo não exclui a possibilidade de dano hepático. Referiram ainda que os níveis séricos de enzimas hepáticas e carga viral < 200 UI/mL ou entre 201 e 2.000 UI/mL não seriam capazes de diferenciar pacientes com ou sem fibrose hepática significativa.

Neste estudo, a fibrose hepática foi avaliada através dos escores APRI e FIB-4 tendo como padrão-ouro a rigidez do fígado aferida pela elastografia (ARFI) em 109 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B. Verificou-se modesta acurácia tanto do APRI como do FIB-4, ou seja, houve concordância entre o ARFI e o APRI em 69 (63%) dos 109 pacientes, nos quais a biópsia hepática seria evitada. Já a concordância entre os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos pelo ARFI e o FIB-4 foi observada em 80 (73%) dos 109 pacientes, nos quais não haveria necessidade de biópsia. Corroborando nossos resultados, (TSENG et al., 2018) em estudo realizado com 101 pacientes com infecção crônica pelo HBV, não cirróticos, verificaram que a elastografia ARFI e os índices APRI e FIB-4 conjuntamente na maioria das vezes poderiam substituir a biópsia hepática. De fato, (SU et al., 2018), avaliando a correlação entre o ARFI e outros testes não invasivos em 534 pacientes, identificaram associação de 0,55 ($p = 0,001$), entre o ARFI e o escore FIB-4. Os autores sugeriram que o ARFI pode servir como importante ferramenta, não invasiva, para a mensuração da rigidez hepática de pacientes com infecção crônica pelo HBV.

Em virtude da ausência de biópsia hepática neste estudo, o que constitui uma de suas principais limitações, realizou-se a análise de classe latente. Nesta situação, onde não se dispõe de um padrão-ouro, constrói-se um modelo matemático envolvendo todas as variáveis, no nosso caso o APRI, o FIB-4 e o ARFI, e através

de análise combinatória estima-se os melhores pontos de corte, que são ajustados simultaneamente para cada variável (MASTELLA et al., 2015).

Segundo ZHENG; MA; LU, (2016) a aplicação da análise de classe latente assegura a precisão e “força” do teste, sobretudo para variáveis não observáveis. Além disso, a análise de classe latente assume que a biópsia hepática é binária ou dicotômica, enquanto o estadiamento da fibrose usa uma escala ordinal de cinco estágios (de F0 a F4), o que corrobora nossa estratificação em dois grupos, fibrose significativa ($\geq F2$) e fibrose leve ($< F2$). Até agora, esta metodologia tem sido usada em poucos estudos em hepatologia (FERNANDES et al., 2017).

Trabalho desenvolvido por ZHENG; MA; LU, (2016) com 554 pacientes com infecção crônica por HBV, utilizou o método de análise de classe latente, para ajuste do modelo proposto: elastografia por Fibroscan®, APRI, FIB-4, globulinas e plaquetas. Identificaram para o APRI sensibilidade de 91% e especificidade 83%, FIB-4 sensibilidade 95% e especificidade 90%, Fibroscan® sensibilidade 66% e especificidade 75%. Da mesma forma que em nosso estudo, a análise de classe latente mostrou aumento de especificidade das variáveis latentes (APRI, FIB-4 e elastografia).

A curva ROC construída neste estudo com a metodologia Classe Latente revelou ponto de corte para o APRI (0,45) e para o FIB-4 (1,31) com sensibilidade e especificidade para o APRI de 69,44% e 93,24%, e para o FIB-4 de 100% e 95,95%, respectivamente.

Com o intuito de avaliar o ponto de corte aqui utilizado para o ARFI (1,21 m/s), como padrão ouro, para separar os dois grupos de fibrose, comparou-se o desempenho do APRI e do FIB-4 (Tabela 3) com o ponto de corte ajustado (1,26 m/s) através da construção da curva ROC pela ACL (Tabela 6). Verificou-se que a diferença na velocidade da onda da elastografia não foi grande e, consequentemente, o desempenho dos testes sorológicos não foi muito diferente. Contudo, através do ponto de corte sugerido pela curva ROC (1,31) construída pela ACL, verificou-se grande desempenho do FIB-4, tanto em sua sensibilidade quanto na especificidade, muito próximo do ponto proposto (1,33) por (LI et al., 2017b), que realizou biópsia hepática em seus 126 pacientes.

Reforçando nossos resultados, meta-análise realizada por (XIAO; YANG; YAN, 2015), identificou que o escore FIB-4 apresentava AUROC de 0,7844 (IC 95%: 0,7450-0,8238), apresentando maior especificidade, com valores de 73,6% e 95,2%,

com valores de corte de 1,45 e 3,25. Por outro lado, o índice APRI apresentou AUROC de 0,7407 (95% CI: 0,7033-0,7781; Z 51,59, P 50,06), e com ponto de corte de 0,5 a 1,5, e sensibilidade e especificidade foram 34,1% e 89,5%, respectivamente.

ABDO et al., (2014) referem ainda que, como as diretrizes de prática atualmente não recomendam biópsia hepática em pacientes com baixos níveis de viremia, e alguns estudos mostram uma porcentagem significativa de pacientes com fibrose $\geq$ F2 quando biopsiados, uma abordagem alternativa seria usar testes não invasivos e técnicas de imagem nesses pacientes e biópsia de reserva para aqueles que apresentam possível fibrose avançada com base testes.

Conclusão

Neste estudo, tendo como padrão a fibrose hepática aferida pela elastografia (ARFI), verificou-se modesta acurácia do APRI e FIB-4. Já através da Análise de Classe Latente, verificou-se que o índice FIB-4 obteve ótimo desempenho, apresentou boa acurácia e seria capaz de evitar a biópsia em grande parte dos casos na identificação de pacientes com fibrose significativa decorrente da infecção crônica pelo vírus da hepatite B. Futuros estudos com maior número de pacientes e utilizando a biópsia hepática como padrão-ouro serão necessários.

Referências

ABDO, A. A. et al. Predictors of significant fibrosis in chronic hepatitis b patients with low viremia. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 1, set. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE et al. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA HEPATITE B E COINFECÇÕES. 2017, p. 120 p.: il.

CARDOSO, ANA CAROLINA FIGUEIREDO-MENDES, CLÁUDIO DE; CARVALHO-FILHO, R. J.. Elastografia hepática transitória. **Rev SBH** 2012, p 3 - 7.

CASSINOTTO, C. et al. Liver Fibrosis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Elastography—Comparison with FibroScan M and XL Probes and FibroTest in Patients with Chronic Liver Disease. **Radiology**, v. 269, n. 1, p. 283–292, out. 2013.

CHENG-HAN LEE et al. Interpretation US Elastography in Chronic Hepatitis B with or without Anti-HBV Therapy. **Appl. Sci**, v. 7, n. 1164, p. 1–12, 2017.

CHOI, M. et al. Serial change of liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse imaging in chronic liver disease: correlation with biochemical markers. **Journal of Medical Ultrasonics**, v. 41, n. 3, p. 311–317, jul. 2014.

FERNANDES, F. F. et al. Latent Class Analysis of Noninvasive Methods and Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C: An Approach without a Gold Standard. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 13 set. 2017.

GILL, U. S. et al. Recent advances in basic science Liver sampling: a vital window into HBV pathogenesis on the path to functional cure. **Gut**, v. 67, p. 767–775, 2018.

LAMPERTICO, P. et al. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. EASL 2017. **Journal of Hepatology**, v. 67, p. 370–398, 2017.

LEÃO, R. DE C. H. et al. Latent Class Analysis: a new vision of the phenomenon of depression in elderly men in the Brazilian Northeast. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 6, p. 814–825, dez. 2017.

LI, J. et al. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography and Serological Markers in Assessment of Liver Fibrosis and Free Portal Pressure in Patients with Hepatitis B. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 23, p. 3585–3592, 23 jul. 2017a.

LI, Q. et al. Evaluation of APRI and FIB-4 for noninvasive assessment of significant fibrosis and cirrhosis in HBeAg-negative CHB patients with ALT $\leq$ 2 ULN: A retrospective cohort study. **Medicine**, v. 96, n. 12, p. 1 - 7, mar. 2017b.

MASTELLA, J. et al. Análise De Classes Latentes: Da Teoria À Prática. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 53, 2015.

OLIVEIRA, V. O. B. DE et al. Advanced liver injury in patients with chronic hepatitis b and viral load below 2,000 IU/mL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

PARIKH, P.; RYAN, J. D.; TSOCHATZIS, E. A. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 3, p. 40, fev. 2017.

PITA, I. et al. Hepatitis B inactive carriers: An overlooked population? **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 241–249, nov. 2014.

QI, X. et al. Transient Elastography for Significant Liver Fibrosis and Cirrhosis in Chronic Hepatitis B: A Meta-Analysis. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2018, p. 13 2018.

SPOREA, I. et al. Is ARFI elastography reliable for predicting fibrosis severity in chronic HCV hepatitis? **World journal of radiology**, v. 3, n. 7, p. 188–93, 28 jul. 2011.

SPOREA, I. et al. Comparative Study Concerning the Value of Acoustic Radiation Force Impulse Elastography (ARFI) in Comparison with Transient Elastography (TE) for the Assessment of Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B and C. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 38, n. 8, p. 1310–1316, 1 ago. 2012.

SRINIVASA BABU, A. et al. Elastography in Chronic Liver Disease: Modalities, Techniques, Limitations, and Future Directions. **RadioGraphics**, v. 36, n. 7, p. 1987–2006, 30 nov. 2016.

STERLING, R. K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1317–1325, jun. 2006.

SU, T.-H. et al. Acoustic Radiation Force Impulse US Imaging: Liver Stiffness in Patients with Chronic Hepatitis B with and without Antiviral Therapy. **Radiology**, v. 288, n. 1, p. 293–299, 27 jul. 2018.

TAI, D.-I. et al. Differences in Liver Fibrosis Between Patients With Chronic Hepatitis B and C. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 34, n. 5, p. 813–821, maio 2015.

TERRAULT, N. A. et al. Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance. **Hepatology**, v. 67, n. 4, p. 1560–1599, abr. 2018.

TSENG, T.-C. et al. Fibrosis-4 index predicts cirrhosis risk and liver-related mortality in 2075 patients with chronic HBV infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 11, p. 1480–1489, jun. 2018.

WAI, C. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, ago. 2003.

WU, J.-F. et al. Clinical Predictors of Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection From Children to Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 9, p. 1408–1416, 11 abr. 2018.

XIAO, G.; YANG, J.; YAN, L. Comparison of diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index and fibrosis-4 index for detecting liver fibrosis in adult patients with chronic hepatitis B virus infection: A systemic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 292–302, 1 jan. 2015.

ZENG, D.-W. et al. Noninvasive models for assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6663–72, 7 ago. 2016.

ZHENG, Y. X.; MA, S. J.; LU, M. H. Diagnostic Estimation of Noninvasive Tests for Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B Patients Without a Gold Standard. **Hepat Mon.**, v. 16, n. 2, p. 1 - 25, 2016.

7.2 ARTIGO 2 – GALECTINA-3 COMO PREDITOR DE FIBROSE HEPÁTICA TENDO A ELASTOGRAFIA ARFI COMO PADRÃO DE RIGIDEZ HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE B

Resumo

Justificativa: O estadiamento da fibrose hepática é fundamental na avaliação prognóstica e definição terapêutica dos pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV). Biomarcadores vêm sendo avaliados, tanto isoladamente quanto em combinação com outros marcadores de fibrose, com o intuito de aumentarem a acurácia no o estadiamento da fibrose hepática. **Objetivo:** Avaliar a fibrose hepática através da quantificação da galectinas-3 (GAL-3), tendo como padrão a rigidez do fígado através da elastografia (ARFI), em pacientes com infecção crônica pelo HBV. **Método:** pacientes com infecção crônica pelo HBV realizaram elastografia hepática (ARFI) e foram divididos em dois grupos conforme o grau: fibrose leve ($< F2$) ou significativa ($\geq F2$), admitindo-se o ponto de corte 1,21 m/s. Em seguida foi realizada a quantificação da GAL-3 e avaliação do método através de curva ROC. **Resultados:** Foram incluídos neste estudo 103 pacientes, sendo 56 masculinos, com média de idade de 42 anos. De acordo com a separação pela elastografia em dois grupos: fibrose significativa = 36 (34,95%) pacientes e não significativa = 67 (65,05%) pacientes. Através da curva ROC foi identificado ponto de corte para a GAL-3= 3,83 com sens = 47%, espec = 76% e acurácia 66%. **Conclusão:** neste estudo, tendo como padrão a fibrose hepática aferida pela elastografia (ARFI), verificou-se modesta acurácia da GAL-3. Futuros estudos com maior número de pacientes e utilizando a biópsia hepática como padrão-ouro serão necessários.

Palavras chave: Técnica de imagem por elasticidade. Galectina-3, humana. Hepatite B chronica. Cirrose hepática. Biomarcadores.

Introdução

A fibrose tecidual é um processo progressivo caracterizado pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC), levando à cicatrização excessiva dos tecidos, lesão de órgãos e declínio da função, chegando à falência. (LI; LI; GAO, 2014). Avanços

recentes indicam que a fibrose dos órgãos compartilha características que incluem lesão, disfunção epitelial e endotelial; proliferação anormal de miofibroblastos (MFb), células musculares lisas e células estreladas, e deposição da MEC. Além disso, uma variedade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos regulam a ativação de células produtoras de MEC em processos pró fibróticos. (LI; LI; GAO, 2014).

Os principais métodos de imagem para avaliação da fibrose hepática incluem a elastografia transitória (FibroScan®), a elastografia com ultrassonografia ou por ressonância magnética (RNM), que estão se disseminando como as modalidades de escolha para estimar a fibrose hepática. (SRINIVASA BABU et al., 2016), (CARDOSO FIGUEIREDO-MENDES; CARVALHO-FILHO, 2012;).

A elastografia por ondas acústicas (*Acoustic radiation force impulse - ARFI*) constitui nova técnica de imagem que se baseia na excitação mecânica do tecido, utilizando pulsos acústicos de curta duração (pulsos de pressão) na região de interesse escolhida pelo operador (ROI) (ZENG et al., 2016), (LIU et al., 2015). Esses pulsos produzem ondas de cisalhamento que se espalham sobre a região de interesse, perpendicularmente ao pulso de pressão acústico, gerando ondas localizadas (CHOI et al., 2014). A elastografia, no entanto, tem limitações, como falhas de mensuração e resultados não interpretáveis que ocorrem em 5 e 15% dos casos, sendo o principal fator limitante a obesidade, seguindo-se a ascite e espaços intercostais estreitos (CASSINOTTO et al., 2013).

Atualmente, dispõe-se de marcadores para predição do grau de fibrose que empregam medidas laboratoriais de rotina, como os níveis séricos de aminotransferases, tempo de protrombina e contagem de plaquetas, como também outros que utilizam estas dosagens em conjunto. Entre estes últimos, encontram-se o Fibrosis 4 index (FIB-4), inicialmente desenvolvido para doença hepática crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), mas recentemente vem sendo utilizado para outras enfermidades hepáticas, e envolve: idade, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e contagem de plaquetas (PLT). Da mesma forma, também se dispõe do *Aspartato aminotransferase Platelet Ratio Index* (APRI) proposto por (WAI et al., 2003) para aferir fibrose e cirrose pelo HCV. Contudo, já se encontram estudos que avaliam seu desempenho também em pacientes com infecção crônica pelo HBV. (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017), (LI et al., 2017). (XIAO; YANG; YAN, 2015).

Os biomarcadores séricos de fibrose hepática são classificados em dois componentes diretos e indiretos na avaliação do status da fibrose. Enquanto os marcadores diretos refletem a fisiopatologia da fibrogênese hepática, representando os componentes da matriz extracelular, a outra classe segue a consequência do dano hepático com a análise laboratorial de rotina. Para uma melhor avaliação, vários escores combinando esses biomarcadores foram propostos. O teste APRI é utilizado em diversos estudos, usando a fórmula $\text{AST} / \text{limite superior do normal} \times 100 / \text{contagem de plaquetas}$, é possível uma estimativa de fibrose, uma vez que os sinais de hipertensão portal resultam num declínio da contagem de plaquetas (JIEANU; UNGUREANU; SĂNDULESCU et al.; 2015.) Portanto, um teste não invasivo ideal para identificar e/ou estadiar a fibrose, deverá ser simples, acurado e sem riscos. (ATAYAN, 2017). O índice APRI, escore FIB-4, *age-platelet index* (AP), *AST/ALT Ratio* (AAR) são os mais utilizados entre estes testes (BURROUGHS; CHOLONGITAS, 2007). No estudo conduzido por ZHANG et al., (2010) foi detectada relação significativa entre as características histológicas e as pontuações referentes ao escore FIB-4 de 212 pacientes com doença hepática crônica pelo HBV.

A fibrose hepática é um processo dinâmico, associado a um ciclo de deposição e degradação da matriz extracelular (MEC). Biomarcadores que espelham o *turnover* da MEC podem ser usados para avaliar mudanças dinâmicas na fibrogênese do fígado, portanto, tanto para o estadiamento da fibrose, como também para monitorar a [sua](#) progressão ou a regressão. (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017).

Assim, os biomarcadores vêm sendo avaliados, tanto isoladamente quanto em combinação com outros marcadores de fibrose hepática, tais como APRI e o FIB-4, o qual principalmente este último tem sido considerado de moderada acurácia diagnóstica, na predição da fibrose pelo HBV (XIAO; YANG; YAN, 2015) conforme sua utilidade diagnóstica, entre os quais, também se encontra a Galectina 3. (GUDOWSKA et al., 2015).

As galectinas pertencem a uma família de proteínas que se ligam a resíduos de galactose terminais em macromoléculas. (ULUCA et al., 2015).

São membros de uma família recém-definida e crescente de lectinas animais, que se ligam aos b-galactosídeos, e fora da célula, ligam-se a glicanos de matriz celular e extracelular, portanto, afetam variedade de processos intra e intercelulares desempenhando papel essencial na função e no desenvolvimento de organismos

multicelulares, incluindo desenvolvimento, diferenciação, adesão célula-célula, interação célula-matriz, regulação do crescimento, apoptose, emendas no RNA e metástase tumoral (ULU et al., 2015). São ainda, detectáveis no citosol e núcleo, participando das sinalizações intracelulares através de vias de interação proteína-proteína, nucleares ou citoplasmáticas, ou influenciando funções celulares, tais como, sinalização intracelular. (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

A GAL-3 é a mais extensivamente estudada, e tanto a estimulação oncogênica, quanto a estimulação viral podem alterar a sua expressão, que se mostra aumentada em vários tumores humanos. A Gal-3 é uma lectina de ligação aos β -galactosídeos, não integrina, (também conhecida como Mac-2, CBP-35, CBP-30, IgEBP, RL-29, L-29, L-31, L-34 e LBL), com peso molecular estimado entre 26.200 e 30.300 Da e é expressa em uma variedade de tecidos e tipos celulares, onde é encontrada principalmente no citoplasma. Exibe função pleiotrópica, desempenhando papel fundamental em muitos processos tanto fisiológicos, quanto patológicos. A expressão aumentada de Gal-3 foi relacionada à motilidade celular e à invasão da matriz extracelular, portanto relacionada à metástase tumoral. (ULU et al., 2015).

A GAL-3 pode estimular a produção de algumas citocinas e quimiocinas via CD98 através de interações com macrófagos, desempenhando importante papel na manutenção da replicação do HBV, consequentemente, contribuindo para processos patológicos resultantes da infecção crônica. A GAL-3 estimula a fibrogênese diminuindo a produção de IL-10. Com base nesses dados, é considerada de grande importância na promoção do processo inflamatório, contribuindo para a progressão da infecção crônica e desenvolvimento da fibrose hepática. Pois, ativa uma variedade de fatores profibróticos, promovendo a proliferação e transformação de fibroblastos e mediando a produção de colágeno. Assim, a GAL-3 pode ser útil para monitorar a cronicidade em diferentes fases da infecção pelo HBV. (ULUCA et al., 2015).

Embora a galectina-3 seja minimamente expressa em hepatócitos normais, verificou-se que ela é significativamente expressa em biópsias hepáticas de pacientes com HCC e cirrose hepática. Investigações posteriores mostraram que a expressão de Gal-3 no HCC é independente do fato de o paciente ter ou não infecção prévia por HBV. (ULU et al., 2015).

Segundo GUDOWSKA et al., (2015), o aumento da expressão tecidual, de galectina-3, é observado principalmente no núcleo de fibroblastos em proliferação. E estudos genéticos demonstraram que a clivagem do gene da galectina-3 bloqueia os miofibroblastos atenuando enfaticamente o processo de fibrose do fígado. Estes dados sugerem que a galectina-3 é necessária para o aumento da produção de matriz celular e para a confecção do dano hepático. Saliente-se ainda, que a galectina-3 afeta diretamente o processo de fagocitose e fibrose, portanto, os níveis dessa lectina podem refletir na progressão da lesão hepática. (GUDOWSKA et al., 2015). Isto sugere que a Gal-3 pode ser um importante mediador e alvo terapêutico eficaz para a fibrose dos tecidos. Assim, uma compreensão mais completa das funções desta lectina e o seu papel nas doenças fibróticas, podem fornecer informações importantes sobre a patogênese da fibrose e delinear novas estratégias que levam a aplicações terapêuticas. (ULUCA et al., 2015), (LI; LI; GAO, 2014).

A não realização da biópsia faz com que na prática clínica muitas vezes não se disponha de um padrão-ouro para avaliar o grau de fibrose em pacientes com infecção crônica pelo HBV. Portanto, o objetivo do nosso estudo é avaliar a fibrose hepática através da quantificação da galectinas-3 (GAL-3), tendo como padrão a rigidez do fígado através da elastografia (ARFI), em pacientes com infecção crônica pelo HBV.

.

Pacientes e Método

Trata-se de estudo prospectivo, transversal, realizado nos ambulatórios de Hepatologia, no Hospital das Clínicas/Universidade Federal de PE, no período de março de 2015 a dezembro de 2018, em que foram incluídos de forma consecutiva e por demanda espontânea pacientes com infecção crônica pelo HBV.

Pacientes com infecção crônica pelo HBV (HBsAg positivo por mais de 6 meses), de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos e que concordaram em participar da pesquisa, após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram incluídos.

Foram excluídos pacientes com coinfeção pelo HIV ou HCV, com consumo de etanol acima de 210 g/semana para homens e 140 g/semana para mulheres, imunodeprimidos ou transplantados.

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa em Ciências da Saúde, conforme Declaração de Helsinque, sob aprovação nº964.965. (ANEXOS A e B), em 04.03.2015.

Antes da elastografia, após jejum de 4 horas, foram coletados 10 mL de sangue venoso para realização de hemograma, ALT, AST, plaquetas, fosfatase alcalina, GGT, INR, quantificação do HBV DNA e dosagem de GAL-3.

Para as dosagens de ALT, AST, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase, as amostras sorológicas foram quantificadas utilizando-se kits para automação da marca *Beckman Coulter*® em equipamento de automação *au680*® e metodologia enzimática conforme preconiza o fabricante.

A quantificação de plaquetas foi realizada através do equipamento de automação para hematologia *Pentra 120*® (*Horiba ABX Diagnostics*), metodologia por impedância, conforme o fabricante.

O INR foi quantificado através do analisador *ACL TOP 500*® (*Werfen company*), conforme o fabricante.

Os níveis séricos de GAL-3 foram determinados utilizando a técnica de enzima imunoensaio do tipo sandwich conforme preconiza o fabricante. *R&D Systems, Inc.*

Todos os pacientes realizaram coleta venosa sanguínea para realização de hemograma, ALT, AST, plaquetas, fosfatase alcalina, GGT, INR, HBV DNA e quantificação de galectinas 3 (GAL-3) após jejum de 4 horas.

Logo após a coleta sanguínea, foi realizada elastografia *ARFI* utilizando-se aparelho ultrassonográfico *Siemens Acuson S2000*™, com o transdutor convexo *4C1* posicionado no hipocôndrio direito, entre o quinto e o sétimo espaço intercostal, para acesso do lobo hepático, com o paciente em decúbito dorsal, e o braço direito em abdução máxima. A região de interesse escolhida foi entre 2 e 3 cm abaixo da cápsula hepática, evitando-se vasos ou tecidos fibrosos. O resultado foi considerado válido depois de realizadas 10 medidas em apneia expiratória em cada paciente, com variação interquartil menor que 30% da mediana, e número de medidas válidas acima de 80% do total de medidas realizadas. A velocidade de onda de cisalhamento foi expressa em m/s.

A análise estatística foi realizada utilizando o software *SPSS Statistics*, versão 25 para Windows (*IBM Corporation*, Amonk, NY, EUA) e o software *MedCalc 15.2* (*MedCalc Software*, Mariakerke, Bélgica). A análise descritiva incluindo frequência,

distribuição, mediana e intervalo interquartílico foi realizada em ambos os grupos, e o teste de *D'Agostino e Pearson* foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. Uma análise uni variada com χ^2 -test foi usada para comparar variáveis categóricas e o teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparar dois grupos independentes de variáveis contínuas.

O desempenho dos Scores APRI e FIB-4 foi avaliado com curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*). Valores de ponto de corte para predizer fibrose significativa ($\geq F2$), com melhor sensibilidade e especificidade determinadas e razão de verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-) foram calculados para esses valores de corte. A área sob a curva (AUC) foi usada para representar a precisão das previsões. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Para a Galectina 3 foi utilizada teste de *Mann-Whitney* comparando dois grupos independentes de variáveis contínuas. Seu desempenho foi avaliado com curva ROC, cujo valor de ponto de corte para predizer fibrose significativa ($\geq F2$), com melhor sensibilidade e especificidade determinadas, razão de verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-) e acurácia foram calculados para esses valores de corte. A área sob a curva (AUC) foi usada para representar a precisão das previsões. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Foram incluídos no estudo 103, pacientes com infecção crônica pelo HBV, cujos dados demográficos estão demonstrados na Tabela 1.

Em relação aos dados epidemiológicos, foi identificado que relação sexual sem preservativo e exposição prévia a cirurgias, foram as situações que alcançaram as maiores frequências 39 (38,8%) e 41 (37,9%), respectivamente.

A mediana da velocidade (SWS) dos 103 pacientes foi 1,11 m/s (0,93-1,26) e mediana de IQR 0,12 m/s (0,08-0,17). De acordo com o ponto-de-corte de 1,21 m/s (SPOREA et al., 2011), (SPOREA et al., 2012) 36 (34,95%) pacientes foram classificados como tendo fibrose significativa ($\geq F2$) e 67 (65,05%) como fibrose leve ($< F2$), conforme a classificação METAVIR. A mediana da medida da rigidez hepática no grupo de pacientes com fibrose significativa foi: 1,32 m/s (1,25 – 1,50) e

no grupo com fibrose leve foi: 0,99 m/s (0,86 - 1,09) ($p < 0,001$). Entre os 36 com fibrose significativa, 29 foram classificados como F2, 1 como F3 e 6 como F4.

Tabela 1 - Características demográficas, clínico-laboratoriais de 103 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B, Recife, 2019.

Características	n=103	
Sexo (n,%)		
Masculino	56	(54,4)%
Feminino	47	(45,6)%
Idade (anos)*	42,0	(34,0-54,0)
IMC (kg/m ²)*	26,8	(24,3-30,6)
HBV	92	(89,3)
HBV + DHGNA	11	(10,7)
AST (/LSN)*	0,72	(0,63-0,96)
ALT (/LSN)*	0,89	(0,63-1,18)
GGT (/LSN)*	0,63	(0,48-1,02)
Fosfatase alcalina (U/L)*	172,6	(133,6-219,6)
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)*	211	(173-249)
INR*	1,05	(1,01-1,10)
HBeAg (n, %)	6	(5,8)
Anti-HBe (n, %)	90	(87,4)
HBV-DNA (log ₁₀ UI/mL)*	2,36	(1,62-3,34)
Galectina 3 (ng/mL)	2,62	(0,89-4,44)
APRI*	0,36	(0,27-0,46)
FIB-4*	0,96	(0,68-1,59)

*Mediana (P₂₅-P₇₅). Distribuição não normal (Teste de normalidade *Shapiro-Wilk* 0,05)
SWS: Velocidade da onda de cisalhamento

Conforme a classificação dos pacientes nos dois grupos observa-se na Tabela - 2 que as variáveis: gênero, plaquetas, INR, HBV DNA, GAL-3, APRI FIB-4, SWS, IQR apresentaram diferenças entre os dois grupos.

Tabela 2 – Características demográficas e clínico-laboratoriais de 103 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B de acordo com o grau de fibrose hepática aferida pela elastografia ARFI, com ponto de corte da literatura (1,21) Recife, 2019.

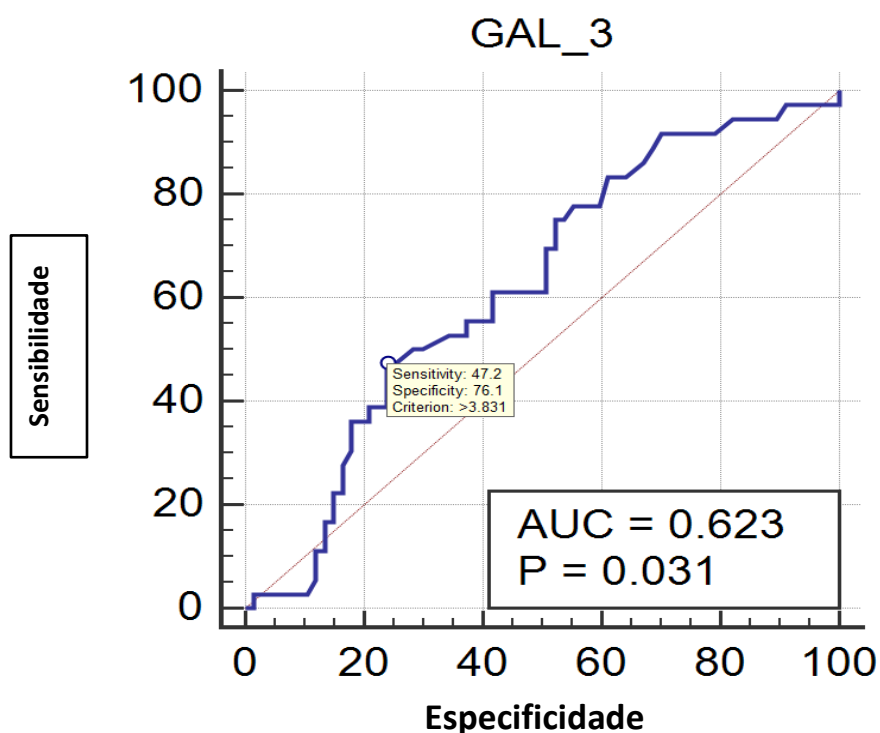
Características	ARFI				p*
	Fibrose significativa (≥ F2) n=36		Fibrose não significativa (< F2) n=67		
Sexo (n, %)					
Masculino	27	(75,0)	29	(43,3)	0,002^a
Feminino	9	(25,0)	39	(56,7)	
Idade (anos)*	42,5	(36,2-58,8)	42,0	(33,0-54,0)	0,219 ^b
IMC (kg/m ²)*	25,7	(22,7-29,2)	28,1	(24,9-31,2)	0,027^b
AST (/LSN)*	0,79	(0,63-1,18)	0,71	(0,62-0,88)	0,162 ^b
ALT (/LSN)*	0,96	(0,63-1,35)	0,88	(0,67-1,13)	0,646 ^b
GGT (/LSN)*	0,82	(0,47-1,24)	0,62	(0,48-0,82)	0,137 ^b
Fosfatase alcalina (U/L)*	170,0	(144,7-221,7)	177,8	(128,5-218,0)	0,641 ^b
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)*	186	(144-239)	218	(187-253)	0,010^b
INR*	1,08	(1,04-1,10)	1,04	(1,01-1,09)	0,034^b
HBeAg (n, %)	4	(11,4)	2	(3,0)	0,177 ^c
Anti-HBe (n, %)	26	(74,3)	64	(95,5)	0,003 ^c
HBV-DNA (log ₁₀ UI/mL)*	2,02	(1,51-2,90)	2,94	(1,77-3,52)	0,024^b
Galectina 3 (ng/mL)	3,52	(1,85-4,71)	2,50	(0,54-3,83)	0,040^b
APRI*	0,39	(0,30-0,70)	0,35	(0,26-0,40)	0,013^b
FIB-4*	1,33	(0,77-1,89)	0,91	(0,64-1,33)	0,005^b
SWS (m/s ²)*	1,32	(1,25-1,50)	0,99	(0,86-1,09)	<0,001^b
IQR*	0,13	(0,09-0,24)	0,11	(0,08-0,16)	0,025^b
Taxa de sucesso (%)*	100	(100-100)	100	(100-100)	0,200 ^b
Medidas válidas (n)*	10	(10-10)	10	(10-10)	0,125 ^b

*Mediana (P₂₅-P₇₅). ^aTeste do qui-quadrado; ^bTeste de Mann-Whitney; ^cTeste exato de Fisher.

Na Figura 1 observamos curva ROC correlação entre os valores quantificados de galectinas 3 (GAL-3) sérica e a elastografia ARFI

Os pontos-de-corte encontrado na curva ROC para o GAL-3 foi 3,83 com 47% de sensibilidade e IC (30,4 – 64,5) e 76% de especificidade e IC (64,1 – 85,7). Razão de verossimilhança positiva (LR+) 1,98 e razão de verossimilhança negativa (LR-) 0,69 e a AUC 0,623 ($p=0,01$) e acurácia 66%.

Figura 1 - Curvas ROC (*receiver operator characteristic curve*) representando o desempenho da galectina-3 (GAL-3) na avaliação da fibrose hepática, tendo como padrão a elastografia ARFI de 103 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.



Avaliando ainda o desempenho da GAL-3, na Tabela -3, observa-se que 17 pacientes foram considerados verdadeiramente positivos e 51 verdadeiramente negativos, ou seja, 68 pacientes além de estarem compatíveis com os resultados da elastografia ARFI e do FIB-4 index, estariam isentos da necessidade de biopsia.

Tabela 3 – Desempenho dos pontos de corte obtidos pela curva ROC para avaliação da fibrose leve e significativa com a variável GAL-3, tendo o ARFI como padrão-ouro (1,21 m/s), em 104 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B; Recife, 2019.

Gal-3	pSWE*		p^a	Sensibilidade		Especificidade		LR+	LR-	A
	F2-F4	F0-F1		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}			(%)
>3,831	17	16	0,016	47,22	30,4-64,5	76,12	64,1-85,7	1,98	0,69	66,02
≤3,831	19	51								

^aTeste do qui-quadrado. A: Acurácia; LR+: Razão de verossimilhança positiva; LR-: Razão de verossimilhança negativa, * *Point Shear Wave Elastography* (Elastografia por onda de cisalhamento pontual).

Discussão

Doenças hepáticas crônicas geralmente progridem de inflamação para fibrose e finalmente a carcinogênese. O estadiamento da progressão da fibrose hepática é inevitável para o acompanhamento e/ou tratamento de pacientes com doenças hepáticas crônicas. (DONG et al., 2017).

De fato, neste estudo, foi identificado que no grupo de pacientes com fibrose significativa ($\geq F2$) sete haviam progredido para as formas mais avançadas de fibrose hepática, de acordo com a escala METAVIR, 1 paciente classificado como estágio F3, com valor de GAL-3: 5,6 ng/mL, e 6 pacientes classificados como estágio F4, com valor médio de GAL-3 5,5ng/mL, e estes provavelmente teriam acompanhamento terapêutico. Saliente-se que esses valores estão acima do ponto de corte da curva ROC da GAL-3

As funções da galectina-3 na fibrose e na imunidade estão sendo extensivamente investigadas, indicando sua possível utilidade terapêutica em certos tipos de doenças fibróticas e infecções. Em muitos casos, as doenças fibróticas progridem para doenças graves, incluindo insuficiência cardíaca, insuficiência renal e cirrose. A galectina-3 pode representar uma abordagem terapêutica para retardar a progressão dessas doenças. Mais estudos clínicos são necessários para desenvolver novos fármacos, visando a modulação da galectina-3. (DONG et al., 2017).

Estudo realizado por ULU et al., (2015) quantificando GAL-3 no soro de 19 pacientes com HCC, 22 com cirrose e 24 com hepatite crônica B e C, identificaram que os valores médios de GAL-3 foram 4,61 ng/mL (± 2.32), 5.68 ng/mL (± 2.2), 1.98 ng/mL (± 1.50) respectivamente. Dentre eles, não havia diferença estatisticamente significativa entre o grupo de HCC e dos portadores de cirrose ($p=0.5$), diferentemente dos portadores de infecção crônica por HBV ou HCV e cirróticos. ($p<0.001$).

Em nosso estudo, envolvendo 104 pacientes com infecção crônica pelo HBV, verifica-se de acordo com o resultado do ARFI que a maioria dos pacientes apresentava fibrose leve ($< F2$), o que deve ser decorrente dos critérios de exclusão que adotamos, em particular, o uso de antivirais contra o HBV. Assim, a amostra foi composta basicamente por portadores inativos do HBV, virgens de tratamento, visto que aqueles com doença mais avançada já estavam em tratamento antiviral e, portanto, não foram incluídos neste estudo. Lembrem-se que, de acordo com o PCDT do Ministério da Saúde do Brasil, os pacientes para receberem terapia antiviral devem apresentar alanina aminotransferase ≥ 2 vezes o LSN, independentemente do HBeAg, ou fibrose significativa ($\geq F2$) na biópsia ou na elastografia. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Semelhantemente ao estudo de ULU et al., (2015), neste estudo, os valores médios de GAL-3 para o grupo de fibrose significativa ($\geq F2$), de acordo com a escala METAVIR, foi 3,52 ng/mL (1,85-4,71) e não significativa ($< F2$) 2,50 ng/mL (0,54-3,83), com nível de significância $p<0.04$. É provável que essa diferença se justifique em função de que a Gal-3 desempenha um papel crítico na regulação da ativação de HSC, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em particular, a ativação de HSC para um fenótipo de miofibroblastos, um evento crítico na deposição de matriz extracelular e no desenvolvimento de cirrose, que depende da expressão aumentada de Gal-3 nos hepatócitos da área da lesão. (SCIACCHITANO et al., 2018).

Da mesma forma, estudo realizado por ULUCA et al., (2015) com 32 pacientes portadores de infecção crônica pelo HBV e 30 crônicos inativos e um grupo controle de 30 crianças saudáveis, quantificaram os níveis séricos de GAL-3 e verificaram que os valores dos pacientes crônicos inativos não diferiram estatisticamente dos valores do grupo controle. Diferentemente do grupo de pacientes portadores de infecção crônica que eram bem mais elevados, (1,1 ng/mL ± 0.3), (0,7 ng/mL ± 0.5), (16,5 ng/mL ± 3.6), respectivamente.

A fim de aumentar a precisão diagnóstica de testes preditores de fibrose hepática, não invasivos, modelos combinados de dois ou mais testes vêm sendo utilizados

Analizando o gráfico de correlação da GAL-3, e os valores da velocidade (m/s) da onda acústica na elastografia hepática (ARFI), de acordo com a tabela de correlação de Pearson, identificamos modesta correlação entre os dois métodos.

Conclusões

Os níveis séricos de galectinas-3 se prestam como ferramenta coadjuvante dentre os métodos não invasivos para predição da fibrose hepática.

Mais estudos clínicos são necessários para desenvolver novos fármacos, visando à modulação da galectina-3.

Referências

ATAYAN, Y. The comparison of liver fibrosis score and non-invasive tests in naive chronic viral hepatitis B patients. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 18, p. 7790–7792, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA HEPATITE B E COINFECÇÕES**, 2017.

BURROUGHS, A. K.; CHOLONGITAS, E. Non-invasive tests for liver fibrosis: Encouraging or discouraging results? **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 751–755, 2007.

CARDOSO, ANA CAROLINA FIGUEIREDO-MENDES, CLÁUDIO DE ; CARVALHO-FILHO, R. J. . **Elastografia hepática transitória**. p. 1 - 7, 2015

CASSINOTTO, C. et al. Liver Fibrosis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Elastography—Comparison with FibroScan M and XL Probes and FibroTest in Patients with Chronic Liver Disease. **Radiology**, v. 269, n. 1, p. 283–292, out. 2013.

CHOI, M. et al. Serial change of liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse imaging in chronic liver disease: correlation with biochemical markers. **Journal of Medical Ultrasonics**, v. 41, n. 3, p. 311–317, 13 jul. 2014.

DONG, R. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 2, p. 599–614, 5 dez. 2017.

FERNANDES, F. F. et al. Latent Class Analysis of Noninvasive Methods and Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C: An Approach without a Gold Standard. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 13 set. 2017.

GUDOWSKA, M. et al. Galectin-3 Concentration in Liver Diseases. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 45, n. 6, p. 669–73, 1 nov. 2015.

JIEANU CF*; UNGUREANU BS*; SĂNDULESCU DL; GHEONEA IA*; TUDORAȘCU DR*; CIUREA ME*; PURCĂREA VL**. Quantificação of liver fibrosis in chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Medicine and Life**, v. Vol. 8, n. Issue 3, p. p.285--290, 2015.

LI, J. et al. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography and Serological Markers in Assessment of Liver Fibrosis and Free Portal Pressure in Patients with Hepatitis B. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 23, p. 3585–3592, 23 jul. 2017.

LI, L. -C. L.-C.; LI, J.; GAO, J. Functions of Galectin-3 and Its Role in Fibrotic Diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 351, n. 2, p. 336–343, 24 set. 2014.

LIU, Y. et al. Optimal linear combination of ARFI, transient elastography and APRI for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis B. **Liver International**, v. 35, n. 3, p. 816–825, 1 mar. 2015.

PARIKH, P.; RYAN, J. D.; TSOCHATZIS, E. A. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 3, p. 40, fev. 2017.

PITA, I. et al. Hepatitis B inactive carriers: An overlooked population? **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 241–249, 1 nov. 2014.

SCIACCHITANO, S. et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 379, 26 jan. 2018.

SPOREA, I. et al. Is ARFI elastography reliable for predicting fibrosis severity in chronic HCV hepatitis? **World journal of radiology**, v. 3, n. 7, p. 188–93, 28 jul. 2011.

SPOREA, I. et al. Comparative Study Concerning the Value of Acoustic Radiation Force Impulse Elastography (ARFI) in Comparison with Transient Elastography (TE) for the Assessment of Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B and C. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 38, n. 8, p. 1310–1316, 1 ago. 2012.

SRINIVASA BABU, A. et al. Elastography in Chronic Liver Disease: Modalities, Techniques, Limitations, and Future Directions. **RadioGraphics**, v. 36, n. 7, p. 1987–2006, 30 nov. 2016.

ULU, M. et al. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. **Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 21, n. 1, p. 47–50, 2015.

ULUCA, Ü. et al. Serum galectin-3 levels in children with chronic hepatitis B infection and inactive hepatitis B carriers. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 1376–1380, 13 maio 2015.

WAI, C. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, ago. 2003.

XIAO, G.; YANG, J.; YAN, L. Comparison of diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index and fibrosis-4 index for detecting liver fibrosis in adult patients with chronic hepatitis B virus infection: A systemic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 292–302, 1 jan. 2015.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 13 dez. 2008.

ZENG, D.-W. et al. Noninvasive models for assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6663–72, 7 ago. 2016.

ZHANG, Y. et al. [Value of FIB-4 for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B]. **Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology**, v. 24, n. 3, p. 215–7, jun. 2010.

8 CONCLUSÕES

Neste estudo, tivemos a oportunidade de identificar alguns biomarcadores como os índices FIB-4, APRI e GAL-3, podem ser preditores de fibrose hepática, sobretudo quando associados a métodos de avaliação já estabelecidos, como a elastografia ARFI.

Identifica-se que na impossibilidade da realização da biopsia hepática, os métodos acima referidos, referenciados pela análise de classe latente, tornam-se modelos ajustados, mais seguros para serem utilizados na ausência de um “padrão ouro”.

Mais estudos clínicos são necessários para desenvolver novos fármacos, visando a modulação da galectina-3.

REFERÊNCIAS

ARIANE MALLAT AND SOPHIE LOTERSZTAJN. celular mechanisms of tissue fibrosis.5.5 Novel insights into liver fibrosis. **Am J Physiol Cell Physiol** **3**, v. 305, n. 8, p. : C789–C799, 2013.

ATAYAN, Y. The comparison of liver fibrosis score and non-invasive tests in naive chronic viral hepatitis B patients. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 18, p. 7790–7792, 2017.

AVERHOFF, F. **Hepatitis B - Chapter 3 - 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC**. Disponível em: <<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/hepatitis-b>>. Acesso em: 3 set. 2018.

AVERHOFF, F. et al. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African Countries. **Journal of Hepatology**, v. 21, n. 1, p. 195–199, 1 out. 2017.

AYED, H. BEN et al. APRI Score as a Predictor of Significant Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis B. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. suppl_1, p. S196–S196, 2017.

BACIGALUPO, M. L. et al. Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 47, p. 8831–8849, 21 dez. 2013.

BAYES-GENIS, A. et al. Head-to-Head Comparison of 2 Myocardial Fibrosis Biomarkers for Long-Term Heart Failure Risk Stratification. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 2, p. 158–166, 21 jan. 2014.

BOGLER, Y.; WONG, R. J.; GISH, R. G. Epidemiology and Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. In: **Hepatitis B Virus and Liver Disease**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 63–89.

BRANCHI, F. et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14568–80, 28 out. 2014.

BURROUGHS, A. K.; CHOLONGITAS, E. Non-invasive tests for liver fibrosis: Encouraging or discouraging results? **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 751–755, 2007.

BUSCH, K.; THIMME, R. Natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 204, n. 1, p. 5–10, 25 fev. 2015.

CASSINOTTO, C. et al. Liver Fibrosis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Elastography—Comparison with FibroScan M and XL Probes and FibroTest in Patients with Chronic Liver Disease. **Radiology**, v. 269, n. 1, p. 283–292, out. 2013.

CHANG, M.-H. Hepatitis B virus infection. **Seminars in fetal & neonatal medicine**, v. 12, n. 3, p. 160–7, jun. 2007.

CHOI, M. et al. Serial change of liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse imaging in chronic liver disease: correlation with biochemical markers. **Journal of Medical Ultrasonics**, v. 41, n. 3, p. 311–317, 13 jul. 2014.

COFFIN, C. S.; ZHOU, K.; TERRAULT, N. A. New and Old Biomarkers for Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection. **Gastroenterology**, 22 nov. 2018.

CROSSAN, C. et al. Cost-effectiveness of non-invasive methods for assessment and monitoring of liver fibrosis and cirrhosis in patients with chronic liver disease: systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 19, n. 9, p. 1–410, jan. 2015.

DIETRICH, C. F. et al. **EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version)** *Ultraschall in der Medizin*, 2017.

FERNANDES, F. F. et al. Latent Class Analysis of Noninvasive Methods and Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C: An Approach without a Gold Standard. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 13 set. 2017.

GILL, U. S. et al. Recent advances in basic science Liver sampling: a vital window into HBV pathogenesis on the path to functional cure. **Gut**, v. 67, p. 767–775, 2018.

GISH, R. **Esqueça os anticorpos de superfície, se você tem carga viral indetectável e HBsAg, você pode ser funcionalmente “curado” - Fundação Hepatite B**. Disponível em: <<http://www.hepb.org/blog/forget-surface-antibodies-if-you-have-both-undetectable-viral-load-and-hbsag-you-might-be-functionally-cured/>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

GUDOWSKA, M. et al. Galectin-3 Concentration in Liver Diseases. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 45, n. 6, p. 669–73, 1 nov. 2015.

HADZIYANNIS, E.; LARAS, A. Viral Biomarkers in Chronic HBeAg Negative HBV Infection. **Genes**, v. 9, n. 10, 27 set. 2018.

HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5060–5, 28 mar. 2006.

HENDERSON, N. C. et al. Galectin-3 Expression and Secretion Links Macrophages to the Promotion of Renal Fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 2, p. 288–298, fev. 2008.

HONG DUONG, T. et al. **Risk Factors for Hepatitis B Infection in Rural Vietnam.** [s.l: s.n.].

HOROWITZ, J. M. et al. Evaluation of hepatic fibrosis: a review from the society of abdominal radiology disease focus panel. **Abdominal radiology (New York)**, v. 42, n. 8, p. 2037–2053, 2017.

JIEANU CF*; UNGUREANU BS*; SĂNDULESCU DL; GHEONEA IA*; TUDORAȘCU DR*; CIUREA ME*; PURCĂREA VL**. Quantificação of liver fibrosis in chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Medicine and Life**, v. Vol. 8, n. Issue 3, p. p.285--290, 2015.

JIN, W. et al. **Diagnostic accuracy of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the prediction of hepatitis B-related fibrosis: a leading meta-analysis****BMC Gastroenterology**. [s.l.] BioMed Central, 14 dez. 2012.

KOBAYASHI, M. et al. Clinical features of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. **Journal of Gastroenterology**, v. 38, n. 7, p. 656–662, 1 jul. 2003.

LAMPERTICO, P. et al. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. EASL 2017. **Journal of Hepatology**, v. 67, p. 370–398, 2017.

LEÃO, R. DE C. H. et al. Latent Class Analysis: a new vision of the phenomenon of depression in elderly men in the Brazilian Northeast. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 6, p. 814–825, dez. 2017.

LI, J. et al. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography and Serological Markers in Assessment of Liver Fibrosis and Free Portal Pressure in Patients with Hepatitis B. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 23, p. 3585–3592, 23 jul. 2017.

LI, L. -C. L.-C.; LI, J.; GAO, J. Functions of Galectin-3 and Its Role in Fibrotic Diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 351, n. 2, p. 336–343, 24 set. 2014.

LIN, C.-L.; KAO, J.-H. New perspectives of biomarkers for the management of chronic hepatitis B. **Clinical and molecular hepatology**, v. 22, n. 4, p. 423–431, dez. 2016.

LOK, D. J. A. et al. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. **Clinical Research in Cardiology**, v. 99, n. 5, p. 323–328, 2010.

LOPEZ-ANDRÈS, N. et al. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. **European Journal of Heart Failure**, v. 14, n. 1, p. 74–81, jan. 2012.

MACKINNON, A. C. et al. Regulation of Transforming Growth Factor- β 1-driven Lung Fibrosis by Galectin-3. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 5, p. 537–546, 1 mar. 2012.

MAO, W. et al. AST to Platelet Ratio Index Predicts Mortality in Hospitalized Patients With Hepatitis B-Related Decompensated Cirrhosis. **Medicine**, v. 95, n. 9, p. e2946, mar. 2016.

MASTELLA, J. Análise De Classes Latentes: Da Teoria À Prática. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 53, 2015.

MIYAKAWA, Y.; MIZOKAMI, M. Classifying Hepatitis B Virus Genotypes. **Intervirolgy**, v. 46, n. 6, p. 329–338, 2003.

MOURA, I. F. et al. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, p. 195–199, mar. 2013.

MOURAD-ZEIDAN, A. A. et al. Expression Profiling of Galectin-3-Depleted Melanoma Cells Reveals its Major Role in Melanoma Cell Plasticity and Vasculogenic Mimicry. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 6, p. 1839–1852, dez. 2008.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 899–909, mar. 2000.

NIKOLAOS T PYRSOPOULOS. Hepatitis B Treatment & Management Approach Considerations, Pharmacologic Management, Surgical Intervention. <https://reference.medscape.com/>, 2018a.

NIKOLAOS T PYRSOPOULOS, K. R. R. HEPATITIS B. **MEDSCAPE**, 2018b.

NISHI, Y. et al. Role of Galectin-3 in Human Pulmonary Fibrosis. **Allergology International**, v. 56, n. 1, p. 57–65, mar. 2007.

NORDER, H. H. H. H. et al. Complete Genomes, Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B Virus, Four of Which Represent Two New Genotypes. **Virology**, v. 198, n. 2, p. 489–503, fev. 1994.

OHKOSHI, S. et al. Natural regression of fibrosis in chronic hepatitis B. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 24, p. 5459–5466, 28 jun. 2016.

ORITO, E. et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. **Hepatology**, v. 34, n. 3, p. 590–594, set. 2001.

PAPATHEODORIDIS, G. V. et al. Follow-up and indications for liver biopsy in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal ALT: A systematic review. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 196–202, jul. 2012.

PARIKH, P.; RYAN, J. D.; TSOCHATZIS, E. A. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 3, p. 40, fev. 2017.

PERAZZO, H. et al. Factors That Could Impact on Liver Fibrosis Staging by Transient Elastography. **International Journal of Hepatology**, v. 2015, p. 1–5, 6 dez. 2015.

PITA, I. et al. Hepatitis B inactive carriers: An overlooked population? **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 241–249, 1 nov. 2014.

QI, X. et al. Transient Elastography for Significant Liver Fibrosis and Cirrhosis in Chronic Hepatitis B: A Meta-Analysis. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2018, p. 3406, 2018.

SANO, H. et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 165, n. 4, p. 2156–64, 15 ago. 2000.

SETO, W. K. et al. Chronic hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 392, n. 10161, p. 2313–2324, nov. 2018.

SILVEIRA, S. S. O pensador. Disponível em:
<<https://www.pensador.com/frase/MTMwNTcwOQ/>> Acesso em: 01/03/2019.

STERLING, R. K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1317–1325, jun. 2006.

SUGAUCHI, F. et al. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: Complete genome sequence and phylogenetic relatedness. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 4, p. 883–892, 1 abr. 2001.

TANG, L. S. Y. et al. Chronic Hepatitis B Infection. **JAMA**, v. 319, n. 17, p. 1802, 1 maio 2018.

TANIGUCHI, T. et al. Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis. **The Journal of rheumatology**, v. 39, n. 3, p. 539–44, 1 mar. 2012.

TATEMATSU, K. et al. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. **Journal of Virology**, v. 83, n. 20, p. 10538–10547, 15 out. 2009.

THI KHANH TUONG, TRAN. NGUYEN MINH, D. The role of ARFI and APRI in diagnosis of liver fibrosis on patients with common chronic liver diseases. **Imaging Med.**, v. 10(5), 2018.

TSENG, C.-H. et al. Can non-invasive method spare liver biopsy? Acoustic Radiation Force Impulse Elastography with APRI and FIB-4 to Identify Significant Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis B Patients. v. 17, n. 5, p. 789–794, 2018a.

TSENG, T.-C. et al. Fibrosis-4 index predicts cirrhosis risk and liver-related mortality in 2075 patients with chronic HBV infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 11, p. 1480–1489, jun. 2018b.

ULU, M. et al. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. **Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 21, n. 1, p. 47–50, 2015.

ULUCA, Ü. et al. Serum galectin-3 levels in children with chronic hepatitis B infection and inactive hepatitis B carriers. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 1376–1380, 13 maio 2015.

UNALP-ARIDA, A.; RUHL, C. E. Liver fibrosis scores predict liver disease mortality in the United States population. **Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 84–95, 1 jul. 2017.

WADHVA, R. K. et al. Diagnostic Accuracy of Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index and Fibrosis 4 Scores in Predicting Advanced Liver Fibrosis in Patients with End-stage Renal Disease and Chronic Viral Hepatitis: Experience from Pakistan. **Journal of translational internal medicine**, v. 6, n. 1, p. 38–42, mar. 2018.

WAI, C. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, ago. 2003.

WU, J.-F.; CHANG, M.-H. Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life - the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts. **Journal of biomedical science**, v. 22, p. 92, 20 out. 2015.

XIANGDONG HU, LANYAN QIU, DONG LIU, L. Q. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography for non-invasive evaluation of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B and C patients: a systematic review and meta-analysis. **Medical Ultrasonography**, v. 19, n. 1, p. 23–31, 31 jan. 2017.

XIAO, G.; YANG, J.; YAN, L. Comparison of diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index and fibrosis-4 index for detecting liver fibrosis in adult patients with chronic hepatitis B virus infection: A systemic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 292–302, 1 jan. 2015.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 13 dez. 2008.

YU, J. H.; LEE, J. IL. Current role of transient elastography in the management of chronic hepatitis B patients. **Ultrasonography (Seoul, Korea)**, v. 36, n. 2, p. 86–94, abr. 2017.

YU, L. et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of Galectin-3 Prevents Cardiac Remodeling by Interfering With Myocardial Fibrogenesis. **Circulation: Heart Failure**, v. 6, n. 1, p. 107–117, jan. 2013.

ZHANG, Y. et al. [Value of FIB-4 for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B]. **Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology**, v. 24, n. 3, p. 215–7, jun. 2010.

ZÖLLNER, B. et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 42–50, 1 jan. 2004.

ZUBERI, R. I. et al. Critical Role for Galectin-3 in Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness in a Murine Model of Asthma. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 6, p. 2045–2053, dez. 2004.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução 466/12)

Pesquisa: Ocorrência das mutações pré core e promotora basal do core do vírus da hepatite B e níveis séricos do HBsAg, carga viral e genotipagem em pacientes com infecção crônica provenientes do serviço de hepatologia do hospital das clínicas da UFPE.

Pesquisadora: Izolda Moura

Orientadora: Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (UFPE)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Ocorrência das mutações pré core e promotora basal do core do vírus da hepatite B e níveis séricos do HBsAg, carga viral e genotipagem em pacientes com infecção crônica provenientes do serviço de hepatologia do hospital das clínicas da UFPE, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Izolda Moura (Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Avenida Professor Moraes Rago, s/n – Bloco “A” Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE, Cidade Universitária 50670-420, Recife – PE. Telefone: (81) 2126-8586. E-mail: izoldafmoura@uol.com.br) e está sob a orientação do Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (e-mail: epalopes@uol.com.br).

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

1 Esta pesquisa tem como objetivo estudar através do exame de sangue de pessoas com hepatite B crônica, alterações genéticas chamadas mutações no vírus da hepatite B para escolha do tratamento adequado e avaliação do curso da infecção crônica, isso significa que será necessária a coleta de 10mL de sangue de uma veia para realizar os exames genéticos. Os materiais que serão utilizados na coleta de sangue são estéreis e descartáveis, o que reduzirá o risco de contaminação.

2 Será necessária apenas uma coleta de sangue. No entanto, caso haja problemas com a amostra de sangue coletada, como material insuficiente ou quebra de tubos, o senhor (a) será convidado a participar de uma nova coleta de sangue. A coleta sanguínea no braço poderá acarretar uma leve dor e pequenos hematomas, contudo, não comprometerá a sua saúde. Para amenizar os riscos, a coleta será realizada por profissionais experientes que tomarão os cuidados necessários para diminuir o risco de que o local onde a veia for mexida fique arroxado e/ou dolorido.

3 Os pacientes analisados na pesquisa terão seus resultados entregues ao seu médico e servirão para classificação e escolha de tratamento mais apropriado de acordo

com o seu caso. Em outras pesquisas futuras, esses exames trarão importantes benefícios que permitirão a detecção dessas alterações genéticas chamadas mutações, no vírus que implicariam na necessidade do uso de tratamento adequado. Como benefício direto você poderá contribuir para que esses exames passem a ser realizados rotineiramente em portadores de hepatite crônica B, pelos serviços de saúde, para escolha de tratamento adequado e avaliação de como será o andamento da doença hepática, para poder se tomar algumas medidas preventivas. O material coletado será processado e armazenado no laboratório do HC/UFPE, por um período mínimo de cinco anos, sob a responsabilidade da pesquisadora Izolda Moura do HC - UFPE.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados de prontuário coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo dos computadores do HC/UFPE sob a responsabilidade da pesquisadora Izolda Moura e do orientador Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes no endereço acima informado pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou ~~extra-judicial~~. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50740-600. Tel.: (81) 2126.8588 - e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Ocorrência das mutações pré core e promotora basal do core do vírus da hepatite B e níveis séricos do HBsAg, carga viral e genotipagem em pacientes com infecção crônica provenientes do serviço de hepatologia do hospital das clínicas da UFPE, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de 201_____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Testemunha 1,

Testemunha 2

Anti-HCV: HIV:	HBsAg:	Anti-HBs:	HBeAg:	Anti-HBe	Anti-
Síndrome Metabólica (PA; Glic.; Cintura abdm; TG; HDL): 1. Sim 2. Não					
Genótipo viral (data):			Carga Viral (data):		
USG (data):					
Dça hepática crônica: 1. Sim 2. Não		Esplenomegalia: 1. Sim 2. Não		Circulação colateral: 1. Sim 2. Não	
Aumento v. porta: 1. Sim 2. Não		Ascite: 1. Sim 2. Não		Esteatose: 1. Sim 2. Não	
EDA (data):					
Varizes de esofágicas: 1. Sim 2. Não		Varizes gástricas: 1. Sim 2. Não		Gastropatia hipertensiva: 1. Sim 2. Não	
Histopatológico (data):					
Grau de fibrose (METAVIR)			Grau de inflamação (METAVIR)		
1. F1 2. F2 3. F3 4. F4 5. HCC Data: ____/____/____			1. F1 2. F2 3. F3 4. F4 5. HCC Data: ____/____/____		
Grau de esteatose			Resposta ao tratamento (HCV-RNA)		
1. Leve 2. Moderada 3. Intensa 4. Esteatohepatite (NASH)			1. Leve 2. Moderada 3. Intensa 4. Esteatohepatite (NASH)		
Week 4:	POS	NEG			
Week 12:	POS	NEG			
Week 24:	POS	NEG			
Week 48:	POS	NEG			
6 meses pós-tto:	POS	NEG			
OBS:					

APÊNDICE C – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

Liver fibrosis evaluation through elastography, serum biomarkers and latent class analysis in chronic B hepatitis

Authors

Izolda Maria Fernandes de Moura^{1, 2}

Ana Lucia Coutinho Domingues^{2, 3}

Andrea Doria Batista³

George Tadeu⁴

Joelma Carvalho Santos²

Norma Arteiro Filgueira³

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes^{2, 3}

1 Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

2 Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

3 Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

4 Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author

Izolda Maria Fernandes de Moura, e-mail: izoldafmoura@gmail.com,

Rua Porto Alegre, 83, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brazil.

zip code 54460-040.

Abstract

Background: Staging of liver fibrosis is essential for the prognostic evaluation and therapeutic definition of patients with chronic hepatitis B (HBV) virus infection.

Objective: To evaluate liver fibrosis, through APRI and FIB-4 scores, using

elastography (ARFI) as a standard of liver stiffness measurements and applying latent class analysis (LCA) in chronic HBV infected patients. **Methods:** patients with chronic HBV infection were subjected to ARFI and were divided into two groups according to liver fibrosis stage: mild fibrosis ($<F2$) or significant fibrosis ($\geq F2$), assuming a cut-off point of 1.21 m/s. Fibrosis evaluation was then evaluated using APRI and FIB-4 in the two groups through a ROC curve. Using the results of fibrosis analysis from these three methods, a combined mathematical model was also constructed applying LCA, admitting the absence of a gold standard method for fibrosis. **Results:** A total of 109 patients were included in the study, of which 61 were men, with a median age of 43 years. According to elastography results, patients were further classified into two groups: 38 patients with significant fibrosis (34.86%) and 71 patients with non-significant fibrosis (65.13%). Through the ROC curve cut-off point was identified for APRI = 0.37 with sens = 63% and spec = 63%, AUC = 0.661; and for FIB-4 = 1.59 with sens = 47% and spec = 87%, AUC = 0.676. Analyzing the ROC curve built from ACL a cut-off point of 0.33 for APRI and AUC of 0,83 was identified, with sens = 69% and spec = 93%; as for FIB-4 = 1.33, AUC = 0,93 with sens = 100% and spec = 96%. **Conclusion:** In this study, applying liver fibrosis measured by ARFI, a modest accuracy of APRI and FIB-4 was reported. Nevertheless, using Latent Class Analysis, it was verified that FIB-4 index presented excellent performance with great accuracy. Therefore, it could avoid unnecessary biopsies to identify most patients with significant fibrosis due to chronic HBV infection. Future studies with a larger number of patients and using liver biopsy as a gold standard will be required.

Keywords: Elasticity Imaging Techniques, Hepatitis B, Chronic, ROC Curve, Liver Cirrhosis, Models, Theoretical.

Introduction

The diagnosis and the decision to treat chronic liver diseases are highly dependent on the liver fibrosis intensity, which makes grading and staging fibrosis very important. In addition, it is not difficult to diagnose advanced disease in the liver through clinical/ laboratory or abdominal ultrasonography, but it is more difficult to evaluate less advanced fibrosis stages. Although liver biopsy is considered the "gold

standard" for evaluation of liver fibrosis; it is an invasive procedure and sometimes there are severe complications. Moreover, due to the analysis of a small fragment of liver parenchyma, sampling errors may occur (IQ et al., 2018) (CHENG-HAN LEE et al., 2017), (CHOI et al., 2014). Considering these disadvantages of biopsy, noninvasive fibrosis markers have been developed and can be divided into serum and imaging markers.

Currently, there are markers for predicting the fibrosis stage, which employs routine laboratory measurements, such as aminotransferases serum levels, prothrombin time and platelet count, as well as others that combine these different biomarkers. The Fibrosis-4 Index (FIB-4) was initially developed for chronic liver disease caused by hepatitis C virus (HCV), but it has recently been used for other liver diseases and requires: age, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and platelet count (PLT). Likewise, the Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI) was proposed by WAI et al., 2003 to measure fibrosis and cirrhosis caused by HCV infection. However, there are also studies that evaluate its performance in patients with chronic HBV infection. (YANG et al., 2017) ,(LI et al., 2017).

The main imaging methods for evaluation of liver fibrosis include transient elastography (FibroScan®), ultrasound elastography or magnetic resonance imaging (MRI), which are being spread as methods of choice for assessing liver fibrosis. (SRINIVASA BABU et al., 2016) (CARDOSO, FIGUEIREDO-MENDES, 2012).

Shear wave elastography (Acoustic radiation force impulse - ARFI) is a new imaging technique based on short-term mechanical stimulation of tissue using acoustic pulses (push pulses) in a region of interest (ROI) chosen by the operator (ZENG et al, 2016). These pulses produce shear waves that spread away from the region of interest, perpendicularly to the acoustic push pulse, generating localized waves (CHOI et al., 2014). Elastography, however, has its limitations, such as measurement failures and non-interpretable results that can occur in 5 to 15% of cases, with obesity considered as the main limiting factor, followed by ascites and narrow intercostal spaces (CASSINOTTO et al. 2013).

However, most studies with serum and imaging markers to assess the stage of liver fibrosis have included chronic HCV infected patients, and there are few data on these methods accuracy in assessing HBV-induced fibrosis. In fact, this advance in the HCV fibrosis evaluation with non-invasive methods reduced greatly the liver

biopsy indication for these patients, making it difficult to indicate the biopsy also for HBV patients.

In clinical practice, the impossibility of performing a biopsy leads to a lack of a gold standard to assess the stage of liver fibrosis in chronic HBV infected patients. In these cases, mathematical models using variables that are not directly analyzed have been applied. These latent variables are used when there is no gold standard available (MASTELLA OBINO, 2015).

Latent Class Analysis (LCA) is a statistical method that identifies distinct groups (latent classes) based on the patterns of observed responses in categorical variables. This method investigates whether the covariance relationship between a group of observable variables is explained by another latent variable (class) (LEÃO et al., 2017). The purpose of this analysis is to identify mutually exclusive subgroups of individuals, based on a set of categorical variables observed, known to be related to the latent variable of interest (MASTELLA OBINO, 2015). In this method, a reference standard is constructed based on the combination of observed and estimated test results from each patient (FERNANDES et al., 2017).

Due to the lack of data using non-invasive methods and the difficulties to obtain liver biopsy as a gold standard to evaluate fibrosis, this study aims to evaluate liver fibrosis through the APRI and FIB-4 scores, using as standard the liver stiffness measurements by elastography (ARFI), and applying latent class analysis (LCA) in chronic HBV infected patients.

Patients and Method

This prospective cross-sectional study was carried out in the Hepatology outpatient clinic at Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), from October 2017 to December 2018, where patients with chronic HBV infection were treated consecutively and on spontaneous demand.

Patients with chronic HBV infection (HBsAg positive for more than 6 months) of both gender, aged over 18 years and who agreed to participate in the study, after reading and signing the informed consent form, were included.

Patients undergoing antiviral treatment, with HIV or HCV co-infection, ethanol consumption above 210 g/week for men and 140 g/week for women, immunosuppressed or transplanted were excluded.

This study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the Health Sciences Center – Federal University of Pernambuco (CCS-UFPE), Recife, Brazil (Approval no. 3.120.530), according to the Declaration of Helsinki.

Before elastography, after a 4-hour fast, a clinical evaluation was performed and 10 mL of venous blood was collected for hemogram, ALT, AST, platelet count, alkaline phosphatase, GGT, INR and quantification of HBV DNA.

Liver evaluation tests, including ALT, AST, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase, were carried out using Beckman Coulter® kits in an au680® autoanalyzer, and enzymatic methods were performed according to the manufacturer's instructions. Platelet count was performed using Pentra 120® automated hematology analyzer (Horiba ABX Diagnostics), and the determination of INR using ACL TOP 500® analyzer (Werfen company), according to manufacturer's instructions.

The APRI index was calculated according to the formula: $(\text{AST level} / \text{AST upper limit of normal}) \times 100 / \text{platelet count}$ (WAI et al., 2003).

The FIB-4 index was calculated according to the formula: $(\text{age} \times \text{AST}) / (\text{platelet count} \times \sqrt{\text{ALT}})$ (YIN et al., 2017), (STERLING et al., 2006).

For the determination of HBsAg, HbeAg, and anti-HBe, Abbott® kits were used in Architect® automation equipment by enzymatic methodology, according to manufacturer's instructions.

The HBV-DNA quantification was performed using a Roche Diagnostics® automation platform system (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan) using the quantitative real-time PCR (qPCR) technique, covering a range of 1-9 log₁₀ (10-10⁹ UI/mL), according to manufacturer's instructions.

Soon after the blood collection, ARFI elastography was performed using a Siemens Acuson S2000™ ultrasound system, with a 4C1 MHz transducer positioned in the right hypochondrium, between the fifth and seventh intercostal space, for hepatic lobe access, with the patient in dorsal decubitus position, and the right arm in maximum abduction. The region of interest was between 2 and 3 cm below the hepatic capsule, avoiding vessels or fibrous tissues. The result was considered valid after performing 10 measures with expiratory apnea in each patient with an interquartile range less than 30% of the median value, and valid number of measures above 80% of the total measurements. The shear wave speed (SWS) was

expressed in m/s. It was used 1.21 m/s as a cut-off value from the literature (SPOREA et al., 2011) to distinguish patients with significant fibrosis ($\geq$ F2).

Statistical method

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics, version 25 for Windows (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and MedCalc software 15.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Descriptive analysis including frequency, distribution, median and interquartile range was performed in both groups, and the Shapiro-Wilk normality test was used to verify the normality of the data distribution.

Descriptive analysis including frequency, distribution, median and interquartile range was performed in both groups, and the Pearson test was used to verify the normality of the data distribution. Univariate analysis with χ^2 -test was used to compare categorical variables and the Mann-Whitney test was used to compare two independent groups of continuous variables. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

The performances of the APRI and FIB-4 scores were evaluated with ROC curves (receiver operating characteristic). Cut-off values for predicting significant fibrosis with better sensitivity and specificity were determined and the likelihood ratio was also calculated. The area under the curve (AUC) was used to represent the accuracy of the predictions.

In the analysis of latent classes, the unobserved phenomena (latent variables) are investigated through an approach using observed variables. Where the events combinations are being positive/negative for each observed variable from the study in each individual will determine the probabilities of the individual to be classified as positive or negative on the latent variable. In the present study, there were $3^2 = 9$ combinations, with the observed variables applied to construct the latent variable that could represent the gold standard in the study: APRI, ARFI, and FIB-4. The cut-off values established in the literature (FIB-4 = 1.33, APRI = 0.33 and ARFI = 1.59) were applied to build the categorical variables (observed). The values above the cut-off established by Li et al. (2017a) were considered positive, and the values equal to or less than the cut-off point, as negative. A latent variable was created and the individuals were classified as positive/negative. Afterward, a ROC curve analysis was performed and sensitivity, specificity, 95% confidence Interval, positive likelihood

ratio (LR+), negative likelihood ratio (LR-) and accuracy (A) were determined for each parameter.

Based on the ARFI cut-off value obtained from the ROC curve using the LCA, the variable ARFI (Cutoff-LCA) was created as positive/negative. Therefore, the ROC curves for FIB-4 and APRI were also analyzed, using the ARFI (Cutoff-LCA) to compare with the cut-off values described in the literature.

Results

It was included in this research 109 patients with chronic HBV infection, whose demographic and laboratory data are described in Table 1.

Regarding the risk factors for HBV infection, it was identified that sexual intercourse without a condom and previous exposure to surgeries were the variables that reached the highest frequencies, 42 (38.5%) and 40 (36.7%), respectively. Among the 109 patients, 11 (10.1%) also had fatty liver disease on ultrasonography.

The median shear wave speed values of all 109 patients was 1.10 m/s (0.94-1.26) with a median IQR of 0.12 (0.08-0.18). Thirty-eight patients were classified in the significant fibrosis ($\geq$ F2) group and 71 in the mild fibrosis ($<$ F2) group, according to METAVIR classification (Table 1). The median values of liver stiffness in the significant fibrosis group was 1.32 m/s (1.25-1.54) and in the mild fibrosis group was: 1.00 m/s (0.87-1, 10) ($p < 0.001$). Among the 38 patients with significant fibrosis, 30 were classified as F2, 1 as F3 and 7 as F4.

Table 1 - Demographic, clinical and laboratory characteristics of 109 patients with chronic hepatitis B virus infection, Recife, Brazil.

Characteristics	n=109	
Sex (n,%)		
Male	61	(56.0) %
Female	48	(44.0) %
Age years)*	43	(34.5-54)
BMI (kg/m ²)*	26.7	(24.4-29.5)
AST (/ULN)*	0.72	(0.63-0.97)
ALT (/ULN)*	0.90	(0.64-1.19)
GGT (/ULN)*	0.64	(0.48-1.00)
Alkaline phosphatase (U/L)*	174.8	(133.6-221.7)
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	209	(171-248)
INR*	1.05	(1.01-1.09)
Anti-HBe (n,%)	96	(88.1)

HBV-DNA (log ₁₀ IU/ml)*	2.40	(1.62-3.40)
APRI*	0.36	(0.27-0.50)
FIB-4*	0.98	(0.69-1.59)

*Median (P₂₅-P₇₅). Non-normal distribution (Shapiro-Wilk normality test <0.05).

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: Body Mass Index; GGT: gamma-glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio score; FIB-4: fibrosis score based on four factors; ULN: upper limits of normal.

Table 2 compares the demographic and clinical-laboratory characteristics analyzed in this study among the two fibrosis groups. It was verified that the following variables: male gender, BMI, platelet count, INR, anti-HBe, HBV DNA, APRI, and FIB-4 presented differences between the two groups.

Table 2 - Demographic and clinical-laboratory characteristics of 109 patients with chronic hepatitis B virus infection according to the stage of liver fibrosis measured by the ARFI elastography, Recife, Brazil.

Characteristics	ARFI				p*
	Significant fibrosis (≥ F2)		Mild fibrosis (<F2)		
n	38	(34.86)%	71	(65.13%)	
Sex (n,%)					
Male	29	(76.3) %	32	(45.1) %	0.002 ^a
Female	9	(23.7) %	39	(54.9) %	
Age (years)*	43.5	(36.8-58.2)	42	(33-54)	0.186 ^b
BMI (kg/m ²) *	25.3	(22.0-29.0)	28.1	(25.0-31.2)	0.012 ^b
AST (/ULN)*	0.83	(0.63-1.21)	0.72	(0.62-0.88)	0.084 ^b
ALT (/ULN)*	0.97	(0.63-1.37)	0.88	(0.67-1.14)	0.477 ^b
GGT (/ULN)*	0.82	(0.47-1.33)	0.62	(0.49-0.85)	0.143 ^b
Alkaline phosphatase (U/L)*	170.0	(145.4-223.0)	178.7	(128.2-219.5)	0.573 ^b
Platelets (10 ⁹ /mm ³) *	182	(140-236)	217	(187-251)	0.004 ^b
INR*	1.08	(1.04-1.10)	1.04	(1.00-1.08)	0.012 ^b
Anti-HBe (n,%)	28	(75.7)	68	(95.8)	0.003 ^c
HBV-DNA (log ₁₀ IU/ml)*	2.02	(1.48-2.95)	2.96	(1.84-3.52)	0.023 ^b
APRI*	0.40	(0.32-0.77)	0.35	(0.26-0.42)	0.006 ^b
FIB-4*	1.36	(0.82-1.88)	0.91	(0.64-1.35)	0.003 ^b

*Median (P₂₅-P₇₅). ^aChi-square test; ^bMann-Whitney test; ^cFisher Exact test.

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: Body Mass Index; GGT: gamma-glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio score; FIB-4: fibrosis score based on four factors; ULN: upper limits of normal.

Based on this stratification in two groups (mild or significant fibrosis), ROC curves were built and APRI and FIB-4 accuracies were calculated, using the ARFI as a gold standard (Figure 1 and Table 3, respectively).

The AUC of APRI was 0.661 and the best cutoff point was 0.37, with 69 (63%) of the 109 true positive and negative patients being observed. Nevertheless, the AUC of FIB-4 was 0.676 and the best cut-off point was 1.59, showing 80 (73%) of the 109 true positive or negative patients.

Figure 1 - Receiver operator characteristic curves showing the performance of (A) APRI and (B) FIB-4 scores in the assessment of liver fibrosis, using ARFI elastography in 109 patients with chronic hepatitis virus infection; Recife, 2019.

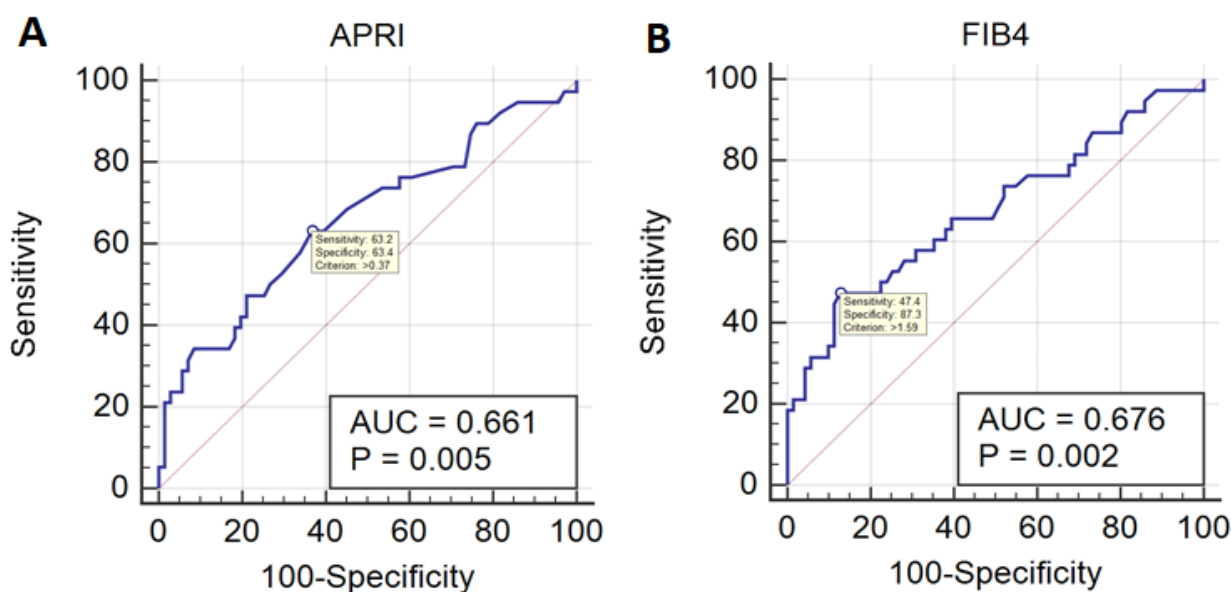


Table 3 - Performance of the cut-off points obtained by the ROC curve for the assessment of mild or significant fibrosis with APRI and FIB-4 scores, using ARFI as a gold standard (1.21 m/s) in 109 patients with chronic infection by the hepatitis B virus; Recife, 2019.

	ARFI		<i>p</i> [*]	Sensitivity		Specificity		LR+	LR-	A (%)
	F≥2	F<2		(%)	IC _{95%}	(%)	IC _{95%}			
APRI										
>0.37	24	26	0.0084	63.16	46.0-78.2	63.38	51.1-74.5	1.72	0.58	63.30
≤0.37	14	45								
FIB-4										
>1.59	18	9	0.0001	47.37	31.0-64.2	87.32	77.3-94.0	3.74	0.60	73.39
≤1.59	20	62								

^aChi-square test. A: Accuracy; LR+: Positive likelihood ratio; LR-: Negative likelihood ratio.

The cut-off points from the literature: APRI = 0.33; FIB-4 = 1.33; (LI et al., 2017a) (FERNANDES et al., 2017) that were initially used, after the latent class analysis, assuming the absence of a gold standard, were then "adjusted" to 0, 45; 1.31 and 1.26, as the best cut-off points for APRI, FIB-4 and ARFI respectively, as described in Table 4.

According to the data in Table 4, after latent class analysis, it was verified that FIB-4 was the most accurate serum marker in the identification of patients with mild or significant fibrosis.

Table 4 - Latent class analysis of 109 patients with chronic hepatitis B virus infection according to the stage of hepatic fibrosis measured by the elastography ARFI, Recife, 2019.

CutOff	Método	Classe Latente (CL)				Sensibilidade	Especificidade		LR+	LR -	A (%)
			F2-F4	F0-F1	(COConCL)	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%		
	APRI (Literatura)	+	-								
0,33	F2-F4	+	36	33	0,45						
	F0-F1	-	0	41		69,44	(51,9 - 83,6	93,24	(84,9 - 97,7)	10,28	0,33 70
	FIB-4										
1,33	F2-F4	+	36	3	1,31						
	F0-F1	-	0	71		100	(90,2 - 100,	95,95	(88,6 - 99,1)	24,67	0 98,16
	ARFI										
1,59	F2-F4	+	8	0	1,26						
	F0-F1	-	28	73		47,22	(30,4 - 64,5	86,3	(76,2 - 93,2)	3,45	0,61 74,31

Figure 2 - Receiver operator characteristic curves showing the performance of APRI, FIB-4 and ARFI variables in the assessment of liver fibrosis according to latent class analysis in 109 patients with chronic hepatitis virus infection; Recife, 2019.

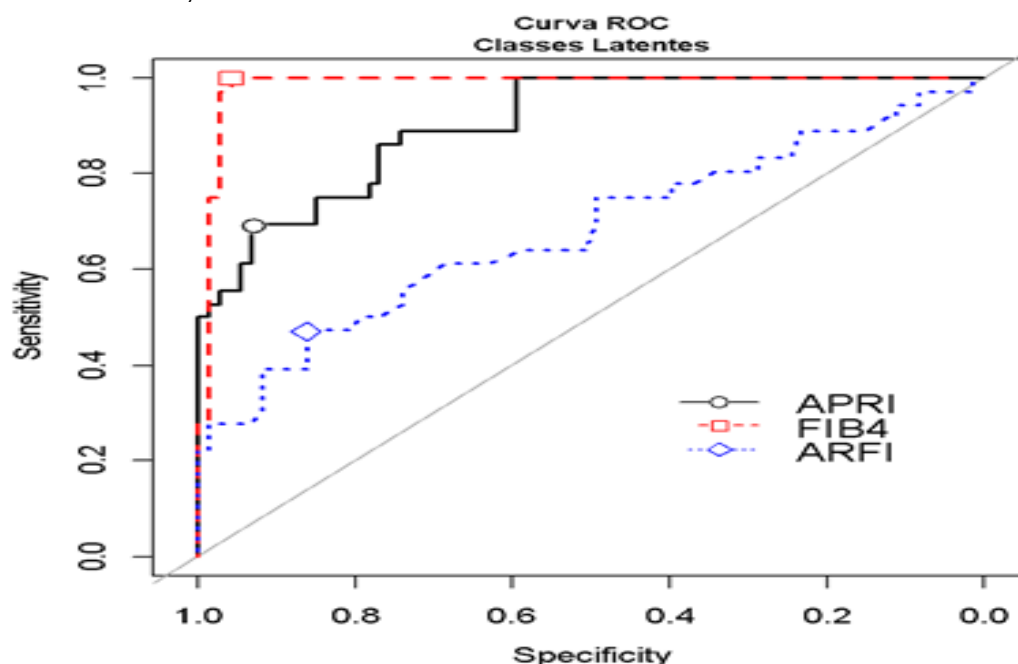


Table 5 shows the probabilities calculated by latent class analysis. In the first row, the truly negative patients (37) were identified, while in the last row, the truly positive ones (8), since they were concordant in the three methods. It can be observed in the definition of the fibrosis stage in 45 (41%) of the 109 patients, without the need for liver biopsy. The other lines show the probability of the dichotomous variable, that is, positive (F2-F4) or negative (F0-F1), with their respective frequencies according to each non-invasive fibrosis evaluation method.

Table 5 - Representative table of the probabilities calculated by latent class analysis for APRI, FIB-4 and ARFI scores in 109 patients with chronic hepatitis B virus infection; Recife, 2019.

				Negative	Positive	Estimated
nAPRI	nFIB4	NARFI	Freq	Class 1	Class 2	n
0	0	0	37	1,000	0,000	38
0	1	0	3	0,997	0.003	3
1	0	0	33	1,000	0,000	33
1	1	0	28	0.095	0.905	28
1	1	1	8	0,000	1,000	8
Total			109			110

After the model adjustment applying latent class analysis, with the identification of a new cut-off point (1.26 m/s) for ARFI, a new curve was built and APRI and FIB-4 accuracy were calculated to compare with the data using the cut-off point of the literature (1.21 m/s).

Figure 3 - Receiver operator characteristic curves showing the performance of APRI and FIB-4 scores measured by the ARFI elastography, using a cut-off point of 1.26, in 109 patients with chronic hepatitis B virus infection according to the stage of hepatic fibrosis; Recife, 2019.

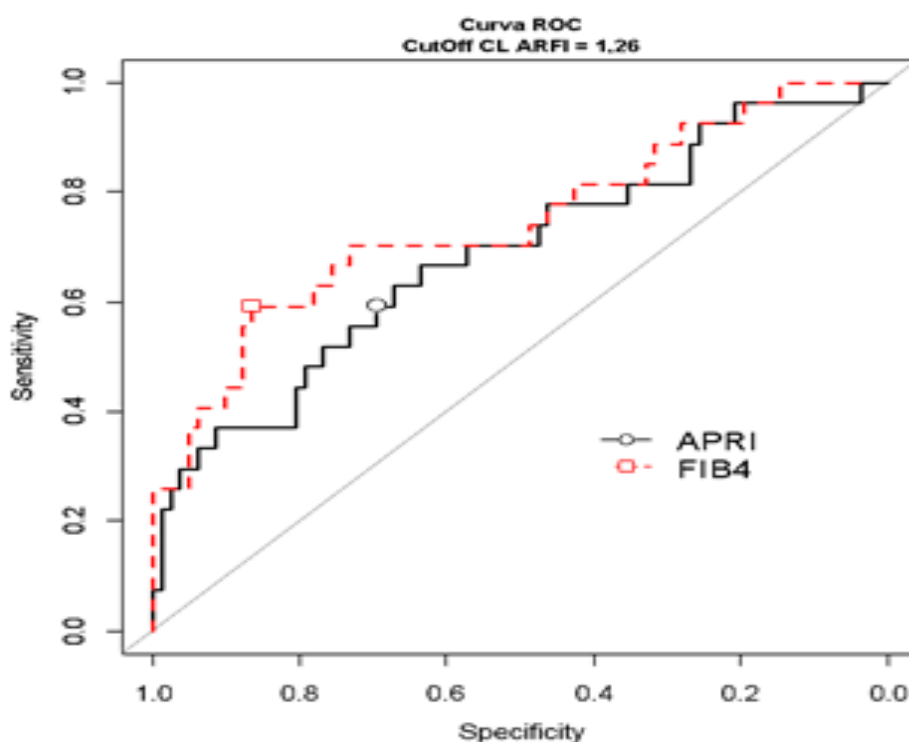


Table 6 - Performance of the cut-off points obtained by the ROC curve for the evaluation of mild or significant fibrosis with APRI and FIB-4 scores, using ARFI as a gold standard (1.26 m/s) in 109 patients with chronic infection by the hepatitis B virus; Recife, 2019.

CutOff	Método	ARFI = 1,26 (CL) (COConARFI)				Sensibilidade	Especificidade				+LR	-LR	A(%)
		F2-F4		F0-F1			Valor	IC 95%	Valor	IC 95%			
Literatura													
	APRI		+	-									
0,33	F2-F4	+	21	48	0,39								
	F0-F1	-	6	34		59,26	38,8 - 77,6	69,51	(58,4 - 79,2)	1,94	0,59	50,46	
	FIB-4												
1,33	F2-F4	+	18	21	1,59								
	F0-F1	-	9	61		59,26	38,8 - 77,6	86,59	(77,3 - 93,1)	4,42	0,47	72,48	

Comparing the cut-off point adjusted by LCA (1.26 m/s) with the cut-off point from the literature (1.21 m/s), using ARFI as a gold standard, there were few changes (Tables 3 and 6). After the adjustment, there was a slight reduction in sensitivity values and an increased specificity for APRI and increased sensitivity values for FIB-4. However, there was an increase in false-positive cases for APRI.

While evaluating APRI and FIB-4 accuracy, using ARFI as a gold standard, with the cut-off point from the literature (1.21 m/s) and the cut-off point obtained after the model adjustment through latent class analysis, a decreased accuracy was observed for both tests (Tables 4 and 6).

Discussion

Recently, non-invasive methods based on elastography or serological tests have been used to assess liver fibrosis (TAI et al., 2015). The use of elastography to assess liver fibrosis has been recommended as first-line method for evaluation of chronic HBV infection, reserving liver biopsy for indeterminate cases (SPOREA et al, 2011a). In addition, the indirect evaluation of the inflammatory activity in the liver through the serum levels of the aminotransferases, associated with the quantification of HBV viral load and serological markers are considered appropriate tools according

to the recent updates of the national and international clinical practice guidelines (GILL et al., 2018), (PCDT, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Current guidelines do not routinely recommend liver biopsy in inactive HBV carriers. However, some patients may have significant liver fibrosis and others may develop fibrosis during follow-up. Despite some limitations, transient elastography seems to be an ideal approach to identify these patients and to repeatedly evaluate liver changes in inactive patients over time (PITA et al., 2014). In fact, meta-analysis, involving 7,808 patients, revealed that transient elastography may be a reliable tool in the detection of liver fibrosis in patients with chronic HBV infection (QI et al., 2018).

According to these results, liver elastography has been recommended by the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) and the European Association for the Study of Liver (EASL) for liver fibrosis assessment (TERRAULT et al., 2018) (LAMPERTICO et al., 2017).

In our study including 109 patients with chronic HBV infection, it was verified according to ARFI results that the majority of patients had mild fibrosis ($<F2$), which should be due to the exclusion criteria adopted, in particular, the use of antiviral drugs against HBV. Thus, the sample consisted basically of patients with less advanced HBV disease and treatment-naïve. Moreover, according to the PCDT of the Brazilian Ministry of Health, patients receiving antiviral therapy should present alanine aminotransferase ≥ 2 times ULN, regardless HBeAg, or significant fibrosis ($\geq F2$) in biopsy or elastography (PCDT, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

In fact, the stratification in two groups according to the stage of mild and significant fibrosis established by ARFI was confirmed by demographic data and laboratory findings. Among the patients with significant fibrosis, there was a male predominance. In fact, Wu et al., (2018) in a study involving 533 patients with chronic HBV infection who underwent transient elastography, reported that the male gender may be predictive of worsening liver fibrosis. The authors suggested that higher levels of testosterone are associated with increased liver damage (WU et al, 2018).

In our study, GGT serum levels were also found to be higher, INR was more extensive, and platelet count was lower in patients with significant fibrosis. In clinical practice, these laboratory findings are commonly found in patients with more advanced liver disease and confirm the intervention performed by the ARFI, stratifying the patients into two groups according to the stage of liver fibrosis.

It was also found that 38 patients with significant fibrosis analyzed in our study had lower HBV-DNA serum levels. Notwithstanding, Abdo et al. (2013) evaluated 97 patients with HBV DNA $<2,000$ IU / mL and observed that 19 (19.6%) had significant fibrosis ($\geq$ F2). Among 116 patients with HBV DNA between 2,000 and 20,000 IU/mL, 21 (18.1%) also had significant fibrosis ($\geq$ F2). They concluded that the rate of occurrence of significant fibrosis is similar ($p = 0.85$) in both those with HBV-DNA $<2,000$ IU/mL and in those with levels between 2,000 and 20,000 IU/mL. These authors suggested that the occurrence of significant fibrosis in about 20% of patients with low viremia, or inactive HBV carriers, could be due to the undulating course of the disease. Thus, it could occur to the aggression to the hepatocyte and consequently fibrosis during the active phases and, later, the transition to the phase of inactive carrier would occur.

In a study conducted by Oliveira et al. (2016) with 37 patients presented viral load $<2,000$ IU / mL and anti-HBe reagent, with the previous diagnosis of inactive patients, revealed that 11 (40.7%) had advanced hepatic fibrosis and, of these, 2 (7.4%) had normal cirrhosis and transaminases. They concluded that being inactive does not exclude the possibility of liver damage. They also reported that serum liver enzymes and viral load <200 IU/mL or between 201 and 2000 IU/mL would not be able to differentiate patients with or without significant liver fibrosis.

In this study, liver fibrosis was evaluated applying APRI and FIB-4 scores, with ARFI as a gold standard of liver stiffness measurement in 109 patients with chronic HBV infection. APRI and FIB-4 showed modest accuracy, showing an agreement between ARFI and APRI in 69 (63%) of the 109 patients, in whom liver biopsy was avoided. The concordance between the true positives and true negatives by ARFI and FIB-4 was observed in 80 (73%) of the 109 patients, in whom there would be no need for a biopsy.

In a study evaluating 101 non-cirrhotic patients with chronic HBV infection, Tseng et al. (2018a) reported that ARFI elastography, APRI, and FIB-4 scores applied together, most of the time, could replace liver biopsy. In fact, Su et al. (2018) evaluated the correlation between ARFI and other noninvasive tests in 534 patients and identified an association of 0.55 ($p = 0.001$) between the ARFI and FIB-4 score. The authors suggested that ARFI may serve as an important non-invasive tool for assessing liver stiffness in chronic HBV infected patients.

Due to the absence of liver biopsy in this study, which is one of its main limitations, a latent class analysis was performed. In this case, where a gold standard is not available, a mathematical model was built involving all variables from this study (APRI, FIB-4 and ARFI), and through combinatorial analysis, the best cut-off points were predicted and adjusted simultaneously for each variable (MASTELLA OBINO, 2015).

According to Zheng et al. (2016), the application of latent class analysis ensures the precision and "strength" of the test, especially for unobservable variables. In addition, a latent class analysis assumes that liver biopsy is binary or dichotomous, while fibrosis staging uses a five-stage ordinal scale (F0 to F4), which corroborates our stratification into two groups, significant fibrosis ($\geq$ F2) and mild fibrosis ($<$ F2). To date, this method has been used in a few studies in hepatology (FERNANDES et al., 2017).

In a study developed by Zheng et al. (2016) with 554 patients with chronic HBV infection, the authors applied the latent class analysis method to fit the following model: Fibroscan®, APRI, FIB-4 elastography, globulins, and platelet count. They identified for APRI sensitivity of 91% and specificity 83%, FIB-4 sensitivity of 95% and specificity of 90%, Fibroscan® sensitivity of 66% and specificity of 75%. Similar to our study, the latent class analysis showed increased specificity of the latent variables (APRI, FIB-4 and elastography).

The ROC curve built in the present study applying the Latent Class method revealed a cut-off point for APRI (0.45) and for FIB-4 (1.31) with sensitivity and specificity for APRI of 69.44% and 93.24 %, and for FIB-4 of 100% and 95.95%, respectively.

In order to evaluate the cut-off point used for ARFI (1.21 m/s), as a gold standard, to stratify the two fibrosis groups, APRI and FIB-4 performance (Table 3) was compared with the adjusted cut-off point (1.26 m/s) through the construction of the ROC curve by LCA (Table 6). It was found that the difference in the shear wave speed was not very large and, consequently, the performance of the serological tests was not very different. However, applying the cut-off point suggested by the ROC curve (1.31 m/s) built by LCA, there was a great performance of FIB-4, both in its sensitivity and specificity, which was very similar to the cut-off point of 1.33 m/s proposed by Li et al. (2017b), who performed liver biopsy in 126 patients.

Corroborating our results, a meta-analysis performed by Xiao et al. (2015) showed that the FIB-4 score had AUC SROC of 0.7844 (95% CI: 0.7450-0.8238) and higher specificity, with values of 73.6% and 95.2%, and cutoff values of 1.45 and 3.25. On the other hand, APRI index presented AUROC of 0.7407 (95% CI: 0.7033-0.7781, Z 51.59, P 50.06), and with a cutoff point of 0.5 to 1.5, and sensitivity and specificity of 34.1% and 89.5%, respectively.

In addition, Abdo et al. (2013) report that, since practice guidelines do not currently recommend liver biopsy in patients with low viremia levels, and some studies show a significant percentage of patients with fibrosis $\geq$ F2 when biopsied, an alternative approach would be the use of noninvasive tests and imaging techniques in these patients and reserve biopsy for those who probably present advanced fibrosis based on these tests.

In conclusion, in this study, using elastography (ARFI) like standard of liver fibrosis assessment, there was a modest accuracy of APRI and FIB-4. Nevertheless, using Latent Class Analysis, it was verified that FIB-4 index presented excellent performance with great accuracy. Therefore, it could avoid unnecessary biopsies to identify most patients with significant fibrosis due to chronic HBV infection. Future studies with a larger number of patients and using liver biopsy as a gold standard will be required.

References

- ABDO, A. A. et al. Predictors of significant fibrosis in chronic hepatitis b patients with low viremia. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 1, set. 2014.
- BRASIL. MINITÉRIO DA SAÚDE et al. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA HEPATITE B E CO INFECÇÕES. 2017, p. 120 p.: il.
- CARDOSO, ANA CAROLINA FIGUEIREDO-MENDES, CLÁUDIO DE; CARVALHO-FILHO, R. J.. Elastografia hepática transitória. **Rev SBH** 2012, p 3 - 7.
- CASSINOTTO, C. et al. Liver Fibrosis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Elastography—Comparison with FibroScan M and XL Probes and FibroTest in Patients with Chronic Liver Disease. **Radiology**, v. 269, n. 1, p. 283–292, out. 2013.

CHENG-HAN LEE et al. Interpretation US Elastography in Chronic Hepatitis B with or without Anti-HBV Therapy. **Appl. Sci**, v. 7, n. 1164, p. 1–12, 2017.

CHOI, M. et al. Serial change of liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse imaging in chronic liver disease: correlation with biochemical markers. **Journal of Medical Ultrasonics**, v. 41, n. 3, p. 311–317, jul. 2014.

FERNANDES, F. F. et al. Latent Class Analysis of Noninvasive Methods and Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C: An Approach without a Gold Standard. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 13 set. 2017.

GILL, U. S. et al. Recent advances in basic science Liver sampling: a vital window into HBV pathogenesis on the path to functional cure. **Gut**, v. 67, p. 767–775, 2018.

LAMPERTICO, P. et al. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. EASL 2017. **Journal of Hepatology**, v. 67, p. 370–398, 2017.

LEÃO, R. DE C. H. et al. Latent Class Analysis: a new vision of the phenomenon of depression in elderly men in the Brazilian Northeast. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 6, p. 814–825, dez. 2017.

LI, J. et al. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography and Serological Markers in Assessment of Liver Fibrosis and Free Portal Pressure in Patients with Hepatitis B. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 23, p. 3585–3592, 23 jul. 2017a.

LI, Q. et al. Evaluation of APRI and FIB-4 for noninvasive assessment of significant fibrosis and cirrhosis in HBeAg-negative CHB patients with ALT $\leq$ 2 ULN: A retrospective cohort study. **Medicine**, v. 96, n. 12, p. 1 - 7, mar. 2017b.

MASTELLA, J. et al. Análise De Classes Latentes: Da Teoria À Prática. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 53, 2015.

OLIVEIRA, V. O. B. DE et al. Advanced liver injury in patients with chronic hepatitis b and viral load below 2,000 IU/mL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

PARIKH, P.; RYAN, J. D.; TSOCHATZIS, E. A. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 3, p. 40, fev. 2017.

PITA, I. et al. Hepatitis B inactive carriers: An overlooked population? **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 241–249, nov. 2014.

QI, X. et al. Transient Elastography for Significant Liver Fibrosis and Cirrhosis in Chronic Hepatitis B: A Meta-Analysis. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2018, p. 13, 2018.

SPOREA, I. et al. Is ARFI elastography reliable for predicting fibrosis severity in chronic HCV hepatitis? **World journal of radiology**, v. 3, n. 7, p. 188–93, 28 jul. 2011.

SPOREA, I. et al. Comparative Study Concerning the Value of Acoustic Radiation Force Impulse Elastography (ARFI) in Comparison with Transient Elastography (TE) for the Assessment of Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B and C. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 38, n. 8, p. 1310–1316, 1 ago. 2012.

SRINIVASA BABU, A. et al. Elastography in Chronic Liver Disease: Modalities, Techniques, Limitations, and Future Directions. **RadioGraphics**, v. 36, n. 7, p. 1987–2006, 30 nov. 2016.

STERLING, R. K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1317–1325, jun. 2006.

SU, T.-H. et al. Acoustic Radiation Force Impulse US Imaging: Liver Stiffness in Patients with Chronic Hepatitis B with and without Antiviral Therapy. **Radiology**, v. 288, n. 1, p. 293–299, 27 jul. 2018.

TAI, D.-I. et al. Differences in Liver Fibrosis Between Patients With Chronic Hepatitis B and C. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 34, n. 5, p. 813–821, maio 2015.

TERRAULT, N. A. et al. Update on Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Hepatitis B: AASLD 2018 Hepatitis B Guidance. **Hepatology**, v. 67, n. 4, p. 1560–1599, abr. 2018.

TSENG, T.-C. et al. Fibrosis-4 index predicts cirrhosis risk and liver-related mortality in 2075 patients with chronic HBV infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 11, p. 1480–1489, jun. 2018.

WAI, C. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, ago. 2003.

WU, J.-F. et al. Clinical Predictors of Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection From Children to Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 9, p. 1408–1416, 11 abr. 2018.

XIAO, G.; YANG, J.; YAN, L. Comparison of diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index and fibrosis-4 index for detecting liver fibrosis in adult patients with chronic hepatitis B virus infection: A systemic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 292–302, 1 jan. 2015.

ZENG, D.-W. et al. Noninvasive models for assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6663–72, 7 ago. 2016.

ZHENG, Y. X.; MA, S. J.; LU, M. H. Diagnostic Estimation of Noninvasive Tests for Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B Patients Without a Gold Standard. **Hepat Mon.**, v. 16, n. 2, p. 1 - 25, 2016.

APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS

Galectin-3 as liver fibrosis predictor using ARFI elastography like liver stiffness pattern in hepatitis B chronic infection patients

Authors

Izolda Maria Fernandes de Moura^{1, 2}

Amanda Regueira Fernandes³

Ana Lucia Coutinho^{2, 4}

Andrea Doria Batista⁴

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes^{2, 4}

Joelma Carvalho Santos²

Kamila de Melo Vilar³

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo³

¹ Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

² Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Centro de Biociências, Universidade de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author

Izolda Maria Fernandes de Moura, e-mail: izoldafmoura@gmail.com,

Rua Porto Alegre, 83, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brazil.

zip code 54460-040.

Abstract

Justification: Liver fibrosis staging is essential for prognostic evaluation and therapeutic definition of patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. Biomarkers have been evaluated, either alone or in combination with other fibrosis markers, in order to increase the accuracy in staging of liver fibrosis. **Objective:** To assess liver fibrosis using serum quantification of galectin-3 (GAL-3), with elastography (ARFI) like standard for liver stiffness assessment in chronic HBV infection patients. **Methods:** chronic HBV infection patients were subjected to ARFI and were divided into two groups according to liver fibrosis stage: mild fibrosis ($<F2$) or significant fibrosis ($\geq F2$), assuming a cut-off point of 1.21 m/s. Fibrosis was then evaluated using serum GAL-3 levels in the two groups through a ROC curve. **Results:** A total of 103 patients were included in the study, of which 56 were men, with a mean age of 42 years. According to elastography results, these patients were further classified into two groups: 36 significant fibrosis patients (34.95%) and 67 non-significant fibrosis patients (65.05%). Analyzing the ROC curve, a 3.88 cut-off point was identified for GAL-3 with 47% of sensitivity, 76% of specificity and 66% of accuracy. **Conclusion:** In this study, using elastography (ARFI) like standard of liver fibrosis assessment, there was a modest accuracy of GAL-3. Future studies with a larger numbers of patients and using liver biopsy as a gold standard will be required.

Keywords: Elasticity Imaging Techniques, galectin-3, human, Hepatitis B, Chronic, Liver Cirrhosis, Biomarkers.

Introduction

Tissue fibrosis is a progressive, severely debilitating disease characterized by of extracellular matrix (ECM) accumulation leading to excessive tissue scarring, organ injury, function decline, and even failure (LI, LI, GAO, 2014). Recent advances indicate that organs fibrosis share features including epithelial and endothelial injury and dysfunction; myofibroblasts (MFb) abnormal proliferation of smooth muscle cells and stellate cells, and ECM deposition. In addition, a variety of cytokines,

chemokines, growth factors, and angiogenic factors regulate the activation of ECM-producing cells in profibrotic processes (LI, LI, GAO, 2014).

The main imaging methods for evaluation of liver fibrosis include transient elastography (FibroScan®), ultrasound elastography or magnetic resonance imaging (MRI), which are being spread as methods of choice for assessing liver fibrosis. (SRINIVASA BABU et al., 2016) (CARDOSO, FIGUEIREDO-MENDES, 2012).

Shear wave elastography (Acoustic radiation force impulse - ARFI) is a imaging technique based on a short-term tissue mechanical stimulation using acoustic pulses (push pulses) in a interest region (ROI) chosen by the operator (ZENG et al, 2016). These pulses produce shear waves which spread away from the interest region, perpendicularly to the acoustic push pulse, generating localized waves (CHOI et al., 2014). Elastography, however, has its limitations, such as measurement failures and non-interpretable results that can occur in 5 to 15% of cases, with obesity considered as the main limiting factor, followed by ascites and narrow intercostal spaces (CASSINOTTO et al. 2013).

Currently, there are markers for predicting the fibrosis stage, which employs routine laboratory measurements, such as aminotransferases serum levels, prothrombin time and platelet count, as well as others that combine these different biomarkers. The Fibrosis-4 Index (FIB-4) was initially developed for chronic liver disease caused by hepatitis C virus (HCV), but it has recently been used for other liver diseases and requires: age, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and platelet count (PLT). Likewise, the Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI) was proposed by WAI et al., 2003 to measure fibrosis and cirrhosis caused by HCV infection. However, there are also studies that evaluate its performance in patients with chronic HBV infection (Parikh; RYAN; TSOCHATZIS, 2017) (Li et al, 2017.) (XIAO; YANG; YAN, 2015).

Serum biomarkers of liver fibrosis are classified into two direct and indirect components in assessing fibrosis status. While direct markers reflect the pathophysiology of liver fibrogenesis, representing the components of the extracellular matrix, the other class follows the consequence of liver damage with routine laboratory analysis. For a better evaluation, several scores matching these biomarkers were proposed. APRI test is used in several studies, to predict fibrosis, since portal hypertension signs result in a decline in platelet counts (JIEANU; UNGUREANU; SĂNDULESCU et al., 2015.) Therefore, an ideal non-invasive test to

identify and/ or stage fibrosis should be simple, accurate and safe (ATAYAN, 2017). Nowadays, APRI, FIB-4, Age-platelet index (AP), AST/ALT ratio (AAR) are the most widely used index (BURROUGHS; CHOLONGITAS, 2007). In a study conducted by ZHANG et al. (2010) a significant relationship was found between the histological characteristics and the scores related to the FIB-4 score of 212 patients with chronic HBV-related liver disease.

Liver fibrosis is a dynamic process, associated with a cycle of ECM deposition and degradation. Biomarkers that mirror the ECM turnover can be used to assess dynamic changes in liver fibrogenesis, therefore both for staging fibrosis but also theoretically to monitor progression or regression (PARIKH; RYAN; TSOCHATZIS, 2017).

Thus, biomarkers have been evaluated either alone or in combination with other markers of liver fibrosis, such as APRI and FIB-4, which mainly has been considered of moderate diagnostic accuracy in the prediction of HBV fibrosis (XIAO; YANG, Yan, 2015) as its diagnostic utility, among which also lies Galectin-3 (GAL-3) (GUDOWSKA et al, 2015).

Galectin belongs to a family of proteins that bind to terminal galactose residues in macromolecules. (ULUCA et al., 2015). They are members of a newly defined and growing family of animal lectins, which bind to β -galactosides, and outside the cell, bind to glycans of cell and extracellular matrix, thus affecting variety of intra and intercellular processes playing essential role in the function and development of multicellular organisms, including development, differentiation, cell-cell adhesion, cell-matrix interaction, growth regulation, apoptosis, RNA *splicing* and tumor metastasis (ULU et al., 2015). They are also detectable in the cytosol and nucleus, participating in intracellular signaling through protein-protein interaction pathways, nuclear or cytoplasmic, or influencing cellular functions, such as, intracellular signaling (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

GAL-3 is the most extensively studied, and both oncogenic stimulation and viral stimulation may alter its expression, which is shown to be increased in several human tumors. GAL-3 is a β -galactoside binding lectin, non- integrin, (also known as Mac-2, CBP-35, CBP-30, IgEBP, RL-29, L-29, L-31, L-34 and LBL), with estimated molecular weight between 26,200 and 30,300 Da and is expressed in a variety of tissues and cell types, where it is mainly found in the cytoplasm. It exhibits pleiotropic function, playing a key role in many physiological and pathological

processes. Increased expression of GAL-3 was related to cell motility and to invasion of the extracellular matrix, thus related to tumor metastasis (ULU et al., 2015).

In addition, GAL-3 can stimulate the production of some cytokines and chemokines via CD98 through interactions with macrophages, playing an important role in the maintenance of HBV replication, thus contributing to pathological processes resulting from chronic infection. GAL-3 stimulates fibrogenesis by decreasing IL-10 production. Based on these data, it is considered of great importance in promoting the inflammatory process, contributing to the progression of chronic infection and development of liver fibrosis. It activates a variety of prophylactic factors, promoting the proliferation and transformation of fibroblasts and mediating the production of collagen. Thus, GAL-3 may be useful for monitoring chronicity at different stages of HBV infection. (ULUCA et al., 2015).

Although galectin-3 is minimally expressed in normal hepatocytes, it has been found to be significantly expressed in liver biopsies of patients with HCC and liver cirrhosis. Subsequent investigations have shown that the expression of GAL-3 in HCC is independent of whether or not the patient has prior HBV infection (ULU et al., 2015).

According to GUDOWSKA et al., (2015), an increased expression of galectin-3 in the tissue was observed mainly in the nucleus of proliferating fibroblasts. Moreover, genetic studies have shown that disruption of the GAL-3 gene blocks myofibroblasts emphatically attenuating the process of liver fibrosis. This data suggests that GAL-3 is required for increased cellular matrix production and for liver damage. It should also be noted that galectin-3 directly affects the process of phagocytosis and fibrosis, therefore the levels of this lectin can reflect the progression of liver damage (GUDOWSKA et al., 2015).

This suggests that GAL-3 may be an important mediator and effective therapeutic target for tissue fibrosis. Thus, a more complete understanding of the functions of this lectin and its role in fibrotic diseases can provide important information on the pathogenesis of fibrosis and outline new strategies that lead to therapeutic applications (ULUCA et al., 2015), (LI, LI, GAO, 2014).

Therefore, the difficulties to perform liver biopsy results in a lack of a gold standard in clinical practice to assess the stage of fibrosis in chronic HBV patients. This study aims to evaluate liver fibrosis through serum GAL-3 levels, using like

standard the liver stiffness measurements by elastography (ARFI) in chronic HBV infected patients.

Patients and Methods

This prospective cross-sectional study was carried out in the Hepatology outpatient clinic at Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), from October 2017 to December 2018, where patients with chronic HBV infection were treated consecutively and on spontaneous demand.

Patients with chronic HBV infection (HBsAg positive for more than 6 months) of both sexes, aged over 18 years and who agreed to participate in the study, after reading and signing the informed consent form, were included.

Patients undergoing antiviral treatment, with HIV or HCV co-infection, ethanol consumption above 210 g/week for men and 140 g/week for women, immunosuppressed or transplanted were excluded.

This study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects of the Health Sciences Center – Federal University of Pernambuco (CCS-UFPE), Recife, Brazil (Approval no. 3.120.530), according to the Declaration of Helsinki.

Before elastography, after a 4-hour fast, a clinical evaluation was performed and 10 mL of venous blood was collected for hemogram, ALT, AST, platelet count, alkaline phosphatase, GGT, INR and quantification of HBV DNA and GAL-3.

Liver evaluation tests, including ALT, AST, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase, were carried out using Beckman Coulter® kits in an au680® autoanalyzer, and enzymatic methods were performed according to the manufacturer's instructions. Platelet count was performed using Pentra 120® automated hematology analyzer (Horiba ABX Diagnostics), and the determination of INR using ACL TOP 500® analyzer (Werfen company), according to manufacturer's instructions.

Serum GAL-3 levels were determined employing the sandwich enzyme immunoassay technique (R & D Systems, Inc), according to manufacturer's instructions.

Soon after the blood collection, ARFI elastography was performed using a Siemens Acuson S2000™ ultrasound system, with a 4C1 MHz transducer positioned

in the right hypochondrium, between the fifth and seventh intercostal space, for hepatic lobe access, with the patient in dorsal decubitus position, and the right arm in maximum abduction. The region of interest was between 2 and 3 cm below the hepatic capsule, avoiding vessels or fibrous tissues. The result was considered valid after performing 10 measures with expiratory apnea in each patient with an interquartile range less than 30% of the median value, and valid number of measures above 80% of the total measurements. The shear wave speed (SWS) was expressed in m/s. It was used 1.21 m/s as a cut-off value from the literature (SPOREA et al., 2011) to distinguish patients with significant fibrosis ($\geq$ F2).

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics, version 25 for Windows (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and MedCalc software 15.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Descriptive analysis including frequency, distribution, median and interquartile range was performed in both groups, and the Shapiro-Wilk normality test was used to verify the normality of the data distribution. Univariate analysis with χ^2 -test was used to compare categorical variables and the Mann-Whitney test was used to compare two independent groups of continuous variables.

The performance of GAL-3 was evaluated with receiver operating characteristic (ROC) curves. Cut-off values for predicting significant fibrosis ($\geq$ F2), with better sensitivity and specificity were determined, and positive (LR+) and negative (LR-) likelihood ratio were also calculated. The area under the curve (AUC) was used to represent the accuracy of the predictions. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

It was included in this study 103 patients with chronic HBV infection, whose demographic and laboratory data are shown in Table 1.

Regarding the risk factors for HBV infection, it was identified that sexual intercourse without a condom and previous exposure to surgeries were the variables that reached the highest frequencies, 39 (38.8%) and 41 (37.9%), respectively.

The median shear wave speed values of all 103 patients was 1.11 m/s (0.93-1.26) with a median IQR of 0.12 (0.08-0.17). According to the point-of-cut of 1.21 m/s (Sporea et al., 2011), (Sporea et al., 2012), 36 patients (34.95%) were classified

in the significant fibrosis ($\geq$ F2) group, and 67 patients (65.05%) in the mild fibrosis ($<$ F2) group, according to METAVIR classification. The median values of liver stiffness in the significant fibrosis group was 1.32 m / s (1.25 - 1.50) and in the mild fibrosis group was 0.99 m/s (0.86-1.09) ($p < 0.001$). Among the 36 patients with significant fibrosis, 29 were classified as F2, 1 as F3 and 6 as F4.

Table 1 - Demographic, clinical and laboratory characteristics of 103 patients with chronic hepatitis B virus infection, Recife, Brazil.

Characteristics	n = 103	
Sex (n,%)		
Male	56	(54.4)
Female	47	(45.6)
Age years)*	42.0	(34.0-54.0)
BMI (kg/m ²)*	26.8	(24.3-30.6)
AST (/ULN)*	0.72	(0.63-0.96)
ALT (/ULN)*	0.89	(0.63-1.18)
GGT (/ULN)*	0.63	(0.48-1.02)
Alkaline phosphatase (U/L)*	172.6	(133.6-219.6)
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	211	(173-249)
INR*	1.05	(1.01-1.10)
HBeAg (n, %)	6	(5.8)
Anti-HBe (n,%)	90	(87.4)
HBV-DNA (log ₁₀ IU/ml)*	2.36	(1.62-3.34)
Galectin-3 (ng/mL)	2.62	(0.89-4.44)
APRI*	0.36	(0.27-0.46)
FIB-4*	0.96	(0.68-1.59)

*Median (P₂₅-P₇₅). Non-normal distribution (Shapiro-Wilk normality test < 0.05).

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: Body Mass Index; GGT: gamma-glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio score; FIB-4: fibrosis score based on four factors; ULN: upper limits of normal.

The Table 2 compares the demographic and clinical-laboratory characteristics analyzed in this study among the two fibrosis groups. It was verified that the following variables: gender, platelets, INR, HBV DNA, GAL-3, APRI, FIB-4, SWS and IQR showed differences between the two groups.

Table 2 - Demographic and clinical-laboratory characteristics of 103 patients with chronic hepatitis B virus infection according to the stage of liver fibrosis measured by ARFI elastography, Recife, 2019.

Characteristics	ARFI				P*
	Significant fibrosis (≥ F2) n = 36		Mild fibrosis (<F2) n = 67		
Sex (n,%)					
Male	27	(75.0)	29	(43.3)	0.002^a
Female	9	(25.0)	39	(56.7)	
Age years)*	42.5	(36.2-58.8)	42.0	(33.0-54.0)	0.219 ^b
BMI (kg/m ²)*	25.7	(22.7-29.2)	28.1	(24.9-31.2)	0.027^b
AST (/ULN)*	0.79	(0.63-1.18)	0.71	(0.62-0.88)	0.162 ^b
ALT (/ULN)*	0.96	(0.63-1.35)	0.88	(0.67-1.13)	0.646 ^b
GGT (/ULN)*	0.82	(0.47-1.24)	0.62	(0.48-0.82)	0.137 ^b
Alkaline phosphatase (U/L)*	170.0	(144.7-221.7)	177.8	(128.5-218.0)	0.641 ^b
Platelets (10 ⁹ /mm ³)*	186	(144-239)	218	(187-253)	0.010^b
INR*	1.08	(1.04-1.10)	1.04	(1.01-1.09)	0.034^b
HBeAg (n, %)	4	(11.4)	2	(3.0)	0.177 ^c
Anti-HBe (n,%)	26	(74.3)	64	(95.5)	0.003 ^c
HBV-DNA(log ₁₀ IU/ml)*	2.02	(1.51-2.90)	2.94	(1.77-3.52)	0.024^b
Galectin-3 (ng/mL)	3.52	(1.85-4.71)	2.50	(0.54-3.83)	0.040^b
APRI*	0.39	(0.30-0.70)	0.35	(0.26-0.40)	0.013^b
FIB-4*	1.33	(0.77-1.89)	0.91	(0.64-1.33)	0.005^b
SWS (m/s ²)*	1.32	(1.25-1.50)	0.99	(0.86-1.09)	<0.001^b
IQR *	0.13	(0.09-0.24)	0.11	(0.08-0.16)	0.025^b
Success rate (%)*	100	(100-100)	100	(100-100)	0.200 ^b
Valid measures (n)*	10	(10-10)	10	(10-10)	0.125 ^b

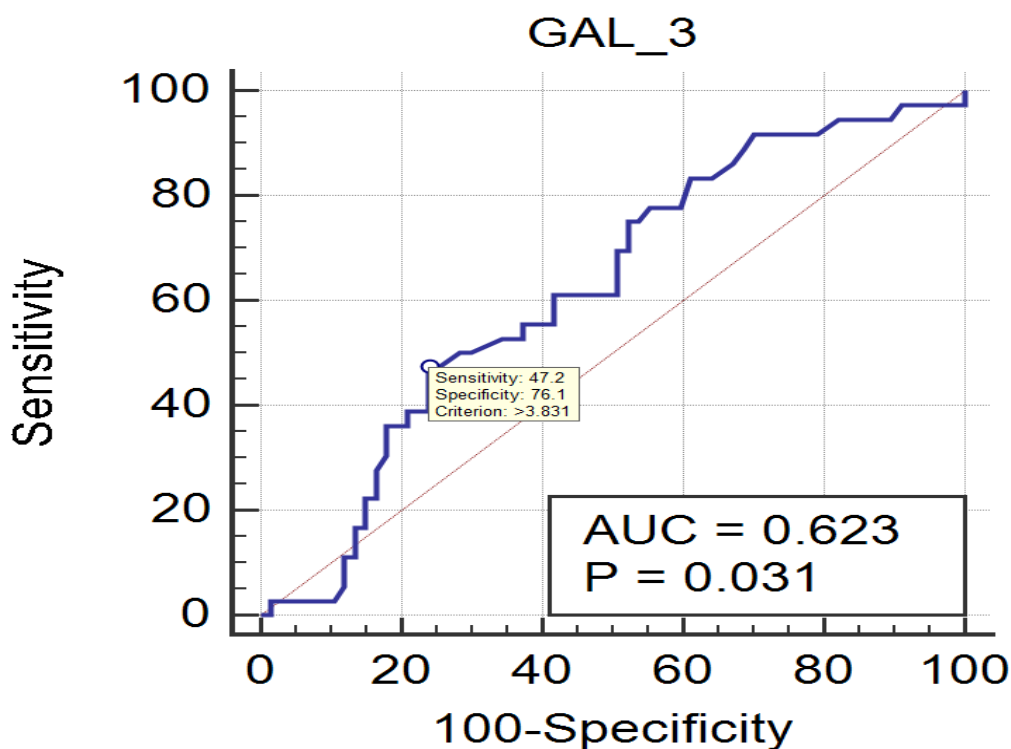
*Median (P₂₅-P₇₅). ^aChi-square test; ^bMann-Whitney test; ^cFisher Exact test.

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; BMI: Body Mass Index; GGT: gamma-glutamyl transferase; INR: International normalized ratio; APRI: aspartate aminotransferase to platelet ratio score; FIB-4: fibrosis score based on four factors; ULN: upper limits of normal; SWS: shear wave speed.

Figure 1 shows the ROC curve performance of galectin-3 in the assessment of liver fibrosis, using ARFI elastography like standard.

The cut-off point found in the ROC curve for GAL-3 was 3.83 with a sensitivity of 47% (95%CI: 30.4-64.5), and a specificity of 76% (95%CI: 64.1-85.7), positive likelihood ratio (LR +) of 1.98, negative likelihood ratio (LR-) of 0.69, AUC of 0.623 (p = 0.01) and accuracy of 66%.

Figure 1 - Receiver operator characteristic curves showing the performance of galectin-3 (GAL-3) in the assessment of liver fibrosis, using ARFI elastography as standard in 103 patients with chronic hepatitis virus infection; Recife, 2019.



The Table 3 shows that 17 patients were considered truly positive and 51 were truly negative, which means that 68 patients showed similar results in ARFI elastography and there would be no need for liver biopsy in these patients

Table 3 - Performance of the cut-off points obtained by the ROC curve for the evaluation of mild or significant fibrosis with GAL-3, using ARFI as a gold standard (1.21 m/s) in 103 patients with chronic hepatitis B virus infection; Recife, 2019.

GAL-3	pSWE [*]		p^a	Sensitivity		Specificity		LR +	LR-	A (%)
	F2-F4	F0-F1		(%)	CI _{95%}	(%)	CI _{95%}			
>3.831	17	16	0.016	47.22	30.4-64.5	76.12	64.1-85.7	1.98	0.69	66.02
≤3,831	19	51								

^aChi-square test. A: Accuracy; LR +: Positive likelihood ratio; LR-: Negative likelihood ratio; * *Point shear wave elastography* (elastografia por onda de cisalhamento pontual).

Discussion

Chronic liver disease usually progresses from inflammation to fibrosis and ultimately to carcinogenesis. Staging of progression of liver fibrosis is unavoidable for the follow-up and / or treatment of patients with chronic liver disease. (DONG et al., 2017).

In fact, in this study, it was identified that in the group of patients with significant fibrosis ($\geq F2$) seven had progressed to the more advanced forms of liver fibrosis, according to the METAVIR scale, 1 patient classified as stage F3 with GAL-3 levels of 5.6 ng/mL, and 6 patients were classified as stage F4, with a mean value of GAL-3 of 5,5 ng/mL, and these would probably have therapeutic follow-up. It should be noted that these values are above the cut-off point of the GAL-3 ROC curve.

Galectin-3 role in fibrosis and immunity is being extensively investigated, indicating its potential therapeutic utility in certain types of fibrotic diseases and infections. In many cases, fibrotic diseases progress to serious diseases, including heart failure, renal failure and cirrhosis. Galectin-3 may represent a therapeutic approach to slow the progression of these diseases. More animal studies and clinical trials are needed to develop new drugs targeting galectin-3 (DONG et al., 2017).

A study by Ulu et al. (2015) quantifying GAL-3 in the serum of 19 patients with HCC, 22 with cirrhosis and 24 with chronic hepatitis B and C, identified that mean values of GAL-3 were 4.61 ng/mL (± 2.32), 5.68 ng/mL (± 2.2), 1.98 ng/mL (± 1.50) respectively. Among them, there was no statistically significant difference between the HCC group and those with cirrhosis ($p = 0.5$), differently from those with chronic HBV or HCV infection and cirrhotic patients. ($p < 0.001$).

In our study including 103 patients with chronic HBV infection, it was verified according to ARFI results that the majority of patients had mild fibrosis ($< F2$), which should be due to the exclusion criteria we adopted, in particular, the use of antiviral drugs against HBV. Thus, the sample consisted basically of inactive carriers of HBV, treatment-naïve, since those with more advanced disease were already in antiviral treatment and, therefore, were not included in this study. Moreover, according to the PCDT of the Brazilian Ministry of Health, patients receiving antiviral therapy should present alanine aminotransferase ≥ 2 times the ULN, regardless of HBeAg, or significant fibrosis ($\geq F2$) in biopsy or elastography (BRAZIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

According to the study developed by Ulu et al. (2015), the mean values of GAL-3 for the significant fibrosis group ($\geq F2$), according to the METAVIR scale, were 3.52 ng/mL (1.85-4.71) and not significant ($< F2$) 2.50 ng/mL (0.54-3.83), with significance level $p < 0.04$. This difference can be justified because GAL-3 plays a critical role in the regulation of HSC activation, both *in vitro* and *in vivo*. In particular, the activation of HSC to a myofibroblast phenotype, a critical event in extracellular matrix deposition and in the development of cirrhosis, depends on the increased expression of GAL-3 in the hepatocytes of the lesion area (SCIACCHITANO et al., 2018).

Similarly, a study conducted by Uluca et al. (2015) with 32 patients with chronic HBV infection and 30 chronic inactive patients and a control group of 30 healthy children, quantified serum GAL-3 levels and verified that the levels of inactive chronic patients did not differ statistically from the levels of the control group. Differently from the group of patients with chronic infection that were much higher (1.1 ng/mL $\pm$ 0.3), (0.7 ng/mL $\pm$ 0.5), (16.5 ng/mL $\pm$ 3.6), respectively.

In order to increase the diagnostic accuracy of non-invasive predictive liver fibrosis tests, combined models of two or more tests have been used. Analyzing the GAL-3 correlation chart and the shear wave speed (m/s) values in liver elastography (ARFI), we identified a modest correlation between the two methods.

Conclusion

Serum galectin-3 levels are useful as a non-invasive method to predict liver fibrosis.

More clinical studies are necessary to develop new drugs in order to modulate GAL-3 action.

References

ATAYAN, Y. The comparison of liver fibrosis score and non-invasive tests in naive chronic viral hepatitis B patients. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 18, p. 7790–7792, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA HEPATITE B E COINFECÇÕES**, 2017.

BURROUGHS, A. K.; CHOLONGITAS, E. Non-invasive tests for liver fibrosis: Encouraging or discouraging results? **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 751–755, 2007.

CARDOSO, ANA CAROLINA FIGUEIREDO-MENDES, CLÁUDIO DE; CARVALHO-FILHO, R. J. . **Elastografia hepática transitória**. p. 1 - 7, 2015

CASSINOTTO, C. et al. Liver Fibrosis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Elastography—Comparison with FibroScan M and XL Probes and FibroTest in Patients with Chronic Liver Disease. **Radiology**, v. 269, n. 1, p. 283–292, out. 2013.

CHOI, M. et al. Serial change of liver stiffness measured by acoustic radiation force impulse imaging in chronic liver disease: correlation with biochemical markers. **Journal of Medical Ultrasonics**, v. 41, n. 3, p. 311–317, 13 jul. 2014.

DONG, R. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 2, p. 599–614, 5 dez. 2017.

FERNANDES, F. F. et al. Latent Class Analysis of Noninvasive Methods and Liver Biopsy in Chronic Hepatitis C: An Approach without a Gold Standard. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 13 set. 2017.

GUDOWSKA, M. et al. Galectin-3 Concentration in Liver Diseases. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 45, n. 6, p. 669–73, 1 nov. 2015.

JIEANU CF*; UNGUREANU BS*; SĂNDULESCU DL; GHEONEA IA*; TUDORAȘCU DR*; CIUREA ME*; PURCĂREA VL**. Quantificação of liver fibrosis in chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Medicine and Life**, v. Vol. 8, n. Issue 3, p. p.285--290, 2015.

LI, J. et al. Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography and Serological Markers in Assessment of Liver Fibrosis and Free Portal Pressure in Patients with Hepatitis B. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 23, p. 3585–3592, 23 jul. 2017.

LI, L. -C. L.-C.; LI, J.; GAO, J. Functions of Galectin-3 and Its Role in Fibrotic Diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 351, n. 2, p. 336–343, 24 set. 2014.

LIU, Y. et al. Optimal linear combination of ARFI, transient elastography and APRI for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis B. **Liver International**, v. 35, n. 3, p. 816–825, 1 mar. 2015.

PARIKH, P.; RYAN, J. D.; TSOCHATZIS, E. A. Fibrosis assessment in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 3, p. 40, fev. 2017.

PITA, I. et al. Hepatitis B inactive carriers: An overlooked population? **GE Portuguese Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 241–249, 1 nov. 2014.

SCIACCHITANO, S. et al. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 379, 26 jan. 2018.

SPOREA, I. et al. Is ARFI elastography reliable for predicting fibrosis severity in chronic HCV hepatitis? **World journal of radiology**, v. 3, n. 7, p. 188–93, 28 jul. 2011.

SPOREA, I. et al. Comparative Study Concerning the Value of Acoustic Radiation Force Impulse Elastography (ARFI) in Comparison with Transient Elastography (TE) for the Assessment of Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B and C. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 38, n. 8, p. 1310–1316, 1 ago. 2012.

SRINIVASA BABU, A. et al. Elastography in Chronic Liver Disease: Modalities, Techniques, Limitations, and Future Directions. **RadioGraphics**, v. 36, n. 7, p. 1987–2006, 30 nov. 2016.

ULU, M. et al. Prognostic significance of serum galectin-3 levels in patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. **Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 21, n. 1, p. 47–50, 2015.

ULUCA, Ü. et al. Serum galectin-3 levels in children with chronic hepatitis B infection and inactive hepatitis B carriers. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 1376–1380, 13 maio 2015.

WAI, C. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, ago. 2003.

XIAO, G.; YANG, J.; YAN, L. Comparison of diagnostic accuracy of aspartate aminotransferase to platelet ratio index and fibrosis-4 index for detecting liver fibrosis in adult patients with chronic hepatitis B virus infection: A systemic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 292–302, 1 jan. 2015.

YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 13 dez. 2008.

ZENG, D.-W. et al. Noninvasive models for assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 29, p. 6663–72, 7 ago. 2016.

ZHANG, Y. et al. [Value of FIB-4 for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B]. **Zhonghua shi yan he lin chuang bing du xue za zhi = Zhonghua shiyan he linchuang bingduxue zazhi = Chinese journal of experimental and clinical virology**, v. 24, n. 3, p. 215–7, jun. 2010.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE (anterior a emenda)

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CEP-CCS-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: OCORRÊNCIA DAS MUTAÇÕES PRÉ CORE E PROMOTORA BASAL DO CORE DO VÍRUS DA HEPATITE B E NÍVEIS SÉRICOS DO HBsAg, CARGA VIRAL E GENOTIPAGEM EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PROVENIENTES DO SERVIÇO DE HEPATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE

Pesquisador: Izolda Moura

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 40431314.3.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 964.965

Data da Relatoria: 04/03/2015

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

s/recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

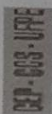
UF: PE

Município: RECIFE

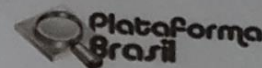
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 964.965

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

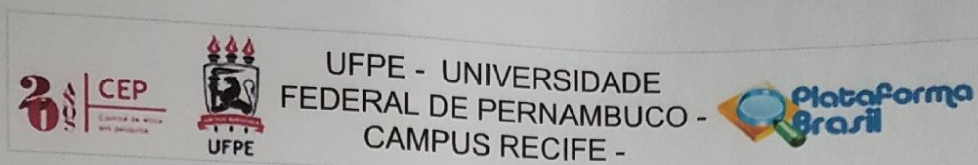
RECIFE, 26 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE (após a emenda)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: "Associação dos níveis séricos das galectinas 3 e 9 com o estágio de fibrose hepática aferido pela elastografia em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B",

Pesquisador: Izolda Moura

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 40431314.3.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.120.530

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Emenda para substituição do título original para: "Associação dos níveis séricos das galectinas 3 e 9 com o estágio de fibrose hepática aferido pela elastografia em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B", uma vez que não pudemos realizar os testes das mutações pré-core e promotora basal do core conforme carta de anuência do Instituto de Medicina Tropical da USP, visto que o referido instituto não foi contemplado com verba suficiente para a execução dessa etapa, o que nos levou a adequação do projeto.

A presente proposta de estudo busca atender parcialmente os requisitos para obtenção do título de doutora em medicina tropical pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE, sob orientação do professor dr. Edmundo Lopes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a associação entre os níveis séricos das galectinas 3 e 9 com o grau de fibrose do fígado avaliado pela elastografia hepática.

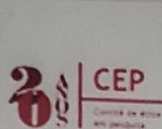
Objetivo Secundário:

Verificar a associação da galectina 3 como marcador de fibrose hepática.

Verificar a associação da galectina 9 como marcador de fibrose hepática.

Verificar a associação das galectinas 3 e 9 com o grau de fibrose do fígado avaliado pelo escore

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UFPE - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
CAMPUS RECIFE -



Continuação do Parecer: 3.120.530

APRI e FIB-4.

Verificar a associação das galectinas 3 e 9 com o grau de fibrose do fígado avaliado pela elastografia hepática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O desconforto de fazer uma coleta sanguínea venosa, que se dá pela inserção da agulha na veia. Para minimizar este efeito, a coleta será feita por profissionais devidamente habilitados e qualificados para a mesma.

O constrangimento por não saber ou querer responder alguma pergunta feita em caráter individualizado.

Benefícios:

A avaliação do grau de fibrose, através do uso da elastografia hepática, associada a quantificação de biomarcadores adequados, GAL-3 e GAL-9, funcionam como ferramentas não invasivas, de risco praticamente inexistente, trazendo maior rapidez ao diagnóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de coorte transversal, envolvendo 70 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, atendidos no ambulatório de hepatologia do HC, portadores de infecção crônica pelo vírus da hepatite B. O estudo envolve a coleta de amostra de sangue venoso realizada rotineiramente nos atendimentos da referida especialidade. A coleta de dados será realizada a partir de entrevista aos pacientes e acesso a dados registrados nos prontuários dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta a documentação necessária.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UFPE - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -
CAMPUS RECIFE -



Continuação do Parecer: 3.120.530

RECIFE, 24 de Janeiro de 2019

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO C – AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS HC/UFPE



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE
SERVIÇOS HOSPITALARES



AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS

Declaramos para os devidos fins, que cederemos à pesquisadora **Izolda Maria Fernandes de Moura** o acesso aos dados de prontuários para serem utilizados na pesquisa “**OCORRÊNCIA DAS MUTAÇÕES PRÉ CORE E PROMOTORA BASAL DO CORE DO VÍRUS DA HEPATITE B E NÍVEIS SÉRICOS DO HBsAg, CARGA VIRAL E GENOTIPAGEM EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PROVENIENTES DO SERVIÇO E HEPATOLOGIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE**”, que está sob a orientação do Prof. Dr. Edmundo Lopes.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento da pesquisadora aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a mesma a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Profª Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Gerente de Ensino e Pesquisa HC/UFPE

Profª Célia M. B. Castro
Gerente de Ensino, Pesquisa
e Extensão - HC/UFPE
SHAP: 1245581

HC-UFPE Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Recife/PE
CEP: 50670-420 Tel: (81) 2126.3953 / 2126.3984 Fax: 3453.3675
e-mail: hcdiretoria@ufpe.br