ALICE TUNG WAN SONG

**C4d e PCR do VHC em tecido no
diagnóstico diferencial entre
rejeição e recidiva de hepatite C em
pacientes transplantados de fígado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Dr. Edson Abdala

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Song, Alice Tung Wan

C4d e PCR do VHC em tecido no diagnóstico diferencial entre rejeição e
recidiva de hepatite C em pacientes transplantados de fígado / Alice Tung Wan
Song. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Edson Abdala.

Descritores: 1.Hepatite C 2.Transplante de fígado 3.Recidiva 4.Rejeição
5.Complemento C4d 6.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/DBD-020/12

Dedicatória

“Aos meus queridos pais,

Ping e Siang

e aos amores da minha vida,

João e Julie”

Agradecimentos

A Deus, por me dar forças, paz e equilíbrio.

Ao Edson, meu orientador presente, profissional competente, pessoa de caráter, honestidade, sinceridade e bom humor, por quem minha admiração e amizade cresceram ao longo desses anos.

Ao Evandro, pela paciência e competência, que me transmitiu um pouco do seu vasto conhecimento em Patologia, e cujas contribuições de planejamento e realização do trabalho foram fundamentais.

Aos meus pais, Ping e Siang, por todo o amor, carinho, incentivo, apoio e educação. Aprendi e ainda aprendo com eles, e sou eternamente grata por terem me mostrado o caminho para me tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu marido João, paixão da minha vida, companheiro de aventuras e desafios, dono do meu coração, pelo eterno amor, apoio, carinho e compreensão.

Aimer, ce n'est pas regarder l'un l'autre, c'est regarder ensemble dans la même direction. – Antoine de Saint-Exupery

À minha filha Julie, “shau pau pei”, que me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia, e que me fez descobrir essa sensação maravilhosamente indescritível de ser mãe.

Aos meus queridos irmãos Alexandre e Arlene, sempre presentes apesar de estarem em cidades diferentes do mundo em diversos momentos.

A todos da minha família, seja ela de sangue ou de fato, por serem a minha base.

Aos meus colegas e amigos do coração a quem um dia faltei para cumprir essa tarefa, especialmente Vivian, Chris, Max, Célia, Eliana, Bárbara, Ivan, Tita, Hermes, Jessica, Flávia, Adriana.

À Roseli, pela competência que foi essencial para a realização e término deste trabalho, e à Vânia e Rose, por todo o apoio e ajuda.

Aos amigos Maristela, Karim, Patricia e Ho, pela valiosa ajuda em diversos momentos do trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Venâncio, Dra. Ana Marli, Dra. Fátima, pelas excelentes sugestões e críticas.

À Alda Wakamatsu, do LIM de Patologia Hepática, pela competência e auxílio na parte laboratorial.

Às colegas da Roche Diagnóstica Evelize Cobo, Sílvia Alfieri e Andrea Bredariol, pelo dinamismo, competência e profissionalismo no auxílio na parte laboratorial.

Aos funcionários do LIM47 Carlos Melo e Caroline, pelo auxílio na parte laboratorial, e D. Clélia e Sueli pelo auxílio administrativo. À Norma, pelo auxílio, carinho e apoio sempre.

Aos funcionários da Divisão de Anatomia Patológica, especialmente Neila, pelo auxílio na parte laboratorial, e Rafael, Douglas, Célio, Lucília, Darci, pelo auxílio administrativo, laboratorial e de arquivo.

Aos funcionários do Serviço de Transplante de Fígado, especialmente Ana Maria, Adriana, Marco, Valdelice, Dorotéia, Silvana, Leonardo, Marcos, Jézio, pelo auxílio administrativo e na coleta de dados de prontuários.

Ao Rogério Prado e João Miraglia, pelo auxílio estatístico.

E finalmente, aos pacientes, grande motivo da realização deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2008/10124-0.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do *International Committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de tabelas

Lista de figuras e gráfico

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O vírus da hepatite C e o transplante de fígado	2
1.2 Diagnóstico diferencial entre recidiva de hepatite C e rejeição celular aguda	4
1.3 C4d	6
1.3.1 Rejeição humoral no transplante de fígado	8
1.3.2 C4d na diferenciação entre rejeição e recidiva de VHC	14
1.4 PCR quantitativa do VHC tecidual.....	17
1.4.1 PCR quantitativa do VHC tecidual no diagnóstico diferencial entre recidiva e rejeição aguda	18
1.5 Outros marcadores na diferenciação entre rejeição e recidiva de VHC.....	21
1.6 Justificativa.....	22
2 OBJETIVOS	23
Objetivo primário	24
Objetivos secundários	24
3 MÉTODO	25
3.1 Desenho do estudo	26
3.2 Casuística.....	26
3.2.1 Seleção de casos	26
3.2.2 Critérios de inclusão e de exclusão	28
3.3 Dados demográficos, clínicos e laboratoriais	29
3.4 Avaliação histológica.....	29
3.4.1 Critério diagnóstico e classificação de hepatite crônica.....	30
3.4.2 Critério diagnóstico e estadiamento de rejeição aguda	30
3.5 Detecção de C4d em tecido hepático.....	31
3.6 Quantificação de RNA do VHC em tecido hepático	32
3.7 Desfechos	35
3.8 Tratamento estatístico	35
3.8.1 Amostra calculada	35

3.8.2	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Casuística.....	39
4.2	Caracterização dos grupos.....	41
4.3	C4d.....	47
4.4	PCR quantitativa de VHC.....	53
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÕES.....	70
7	ANEXOS.....	72
8	REFERÊNCIAS	81

Listas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição das variáveis quantitativas demográficas e do transplante dos 98 casos - comparação entre os grupos	41
Tabela 2 -	Comparações múltiplas das variáveis quantitativas demográficas entre os grupos	42
Tabela 3 -	Descrição das variáveis categóricas dos 98 casos – comparação entre grupos	43
Tabela 4 -	Comparação entre os grupos I (Rejeição em VHC) e III (Rejeição sem VHC) segundo estadiamento e graduação da rejeição	45
Tabela 5 -	Comparação entre os grupos II (Recidiva VHC) e IV (Hepatite crônica não-tx) segundo a classificação de Ishak...	46
Tabela 6 -	Comparação da quantificação de C4d entre os 4 grupos.....	50
Tabela 7 -	Resultados de C4d portal segundo as variáveis categóricas dos 98 casos	51
Tabela 8 -	Correlações de Spearman de C4d portal com as características quantitativas e qualitativas ordenadas dos 98 casos	52
Tabela 9 -	Comparação da quantificação de RNA de VHC nos 3 grupos de pacientes com VHC	54
Tabela 10 -	Quantificação de PCR do VHC segundo as variáveis qualitativas nos 3 grupos de pacientes com VHC	55
Tabela 11 -	Correlações de Spearman de PCR de VHC com as variáveis quantitativas e qualitativas ordinais dos 3 grupos de pacientes com VHC.....	56
Tabela 12 -	Descrição dos pontos de corte de PCR de VHC para o diagnóstico de recidiva de VHC segundo valores de sensibilidade e especificidade	58
Tabela 13 -	Acurácia diagnóstica da PCR de VHC para prever recidiva de VHC em 51 casos com ponto de corte $\geq 58,15$ UI/ml	59
Tabela 14 -	Descrição do local de deposição e forma de graduação dos principais trabalhos com C4d em transplante de fígado.....	66

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICO

Figura 1 -	As vias de ativação do sistema complemento. Traduzido e adaptado de Dunkelberger e Song ²⁸	8
Figura 2 -	Fluxograma de seleção e distribuição nos grupos	40
Figura 3 -	Amostra representativa do grupo I (rejeição em VHC) com rejeição leve (Banff 1/1/1) e positividade de C4d no endotélio do espaço porta (aumento 20x)	47
Figura 4 -	Caso do grupo I com rejeição leve (Banff 1/1/1) e positividade de C4d no compartimento centrolobular (aumento 20x)	48
Figura 5 -	Caso de transplante por cirrose alcoólica (grupo III) com rejeição grave (Banff 3/3/3) e positividade de C4d no compartimento centrolobular (aumento 20x).	48
Figura 6 -	Caso do grupo IV – hepatite crônica não-tx com grau de fibrose 3 e atividade periportal 2 com positividade de C4d no espaço porta (aumento 20x)	49
Gráfico -	Curva ROC da PCR do VHC em tecido para definição do ponto de corte que discrimina paciente com recidiva de VHC de rejeição aguda pós-transplante de fígado por VHC.....	59

Resumo

Song ATW. *C4d e PCR do VHC em tecido no diagnóstico diferencial entre rejeição e recidiva de hepatite C em pacientes transplantados de fígado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 92 p.

INTRODUÇÃO: Doença hepática avançada causada pelo vírus da hepatite C (VHC) é a principal causa de indicação de transplante de fígado. No entanto, mais da metade dos casos apresenta recidiva histológica em até um ano. A biópsia hepática tem importante papel no diagnóstico da recidiva e na orientação do manejo, porém o diagnóstico diferencial com rejeição pode ser difícil. O marcador tecidual C4d e a PCR quantitativa para o VHC têm sido propostos como métodos auxiliares nessa diferenciação diagnóstica. **OBJETIVOS:** O objetivo primário foi avaliar o papel da deposição de C4d e da PCR quantitativa de VHC tecidual no diagnóstico diferencial entre rejeição aguda e recidiva de hepatite C em pacientes transplantados de fígado. Os objetivos secundários foram: avaliar a associação de deposição de C4d com as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e histológicas de rejeição aguda e hepatite crônica; e avaliar a associação da PCR quantitativa de VHC tecidual com as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e histológicas de hepatite crônica. **MÉTODO:** Estudo diagnóstico retrospectivo com amostras de biópsia hepática. Os casos foram selecionados de acordo com o diagnóstico histológico, e divididos em quatro grupos: rejeição em pacientes transplantados por VHC (grupo I), recidiva do VHC pós-transplante (grupo II), rejeição em pacientes transplantados sem VHC (grupo III), e hepatite crônica em pacientes não-transplantados (grupo IV). Foi realizada revisão de prontuários e do sistema informatizado laboratorial para obtenção de dados demográficos, clínicos e laboratoriais. As amostras de biópsia hepática foram submetidas a imunohistoquímica para detecção de C4d (com gradação quantitativa dos compartimentos portal, sinusoidal e centrolobular) e quantificação de RNA do VHC. Os seguintes desfechos foram comparados entre os grupos: quantificação de C4d no tecido hepático e quantificação de RNA de VHC no tecido hepático. **RESULTADOS:** Foram incluídos 28 casos no grupo I, 25 casos no grupo II, 20 casos no grupo III, e 25 casos no grupo IV. O principal compartimento de deposição foi o portal, com intensa deposição no grupo de hepatite crônica não-transplantado (grupo IV), maior em relação aos demais grupos ($p=0,002$). O C4d portal teve intensa correlação com o grau de inflamação periportal. Não houve diferença estatística na quantificação de C4d entre os grupos de rejeição e recidiva em pacientes com hepatite C. A quantificação de RNA de VHC tecidual foi maior nas amostras de recidiva de VHC em relação ao grupo de rejeição em VHC ($p<0,001$), e houve correlação significativa com a PCR quantitativa de VHC sérica e com o tempo de transplante. A área abaixo da curva ROC da quantificação tecidual de RNA do VHC foi de 0,818 (IC95% 0,695-0,942), e com um ponto de corte de 58,15 UI/ml, a sensibilidade para o diagnóstico de recidiva de VHC foi de 70%, a especificidade de 89%, e os valores preditivos positivo e negativo foram 84% e 78%, respectivamente. **CONCLUSÕES:** Não houve diferença na quantificação de C4d entre os grupos de rejeição em paciente

transplantado por VHC e recidiva de VHC, porém houve maior quantificação de C4d portal no grupo de hepatite C crônica não-transplantado comparando-se com os demais grupos. Houve correlação entre a quantificação de C4d portal e o grau de inflamação periportal na hepatite crônica. A quantificação de PCR de VHC foi maior no grupo de recidiva de VHC comparado ao grupo de rejeição em paciente com VHC, sendo esse teste um potencial diferenciador de rejeição aguda e recidiva da hepatite.

Descritores: 1. Hepatite C 2. Transplante de fígado 3. Recidiva 4. Rejeição 5. Complemento C4d 6. Reação em cadeia da polimerase

Summary

Song ATW. *Characterization of C4d deposits and tissue HCV PCR in the differential diagnosis between rejection and hepatitis C recurrence after liver transplantation* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 92 p.

BACKGROUND: Advanced liver disease caused by hepatitis C virus (HCV) is the leading indication for liver transplantation worldwide. More than half of patients present disease recurrence up to one year after transplantation. Liver biopsy plays an essential role in disease recurrence diagnosis and consequently in its treatment, and differential diagnosis regarding acute rejection may sometimes be difficult. Tissue marker C4d and quantification of tissue HCV RNA have been proposed as auxiliary methods in this differential diagnosis. **OBJECTIVES:** Main objective was to evaluate the role of C4d deposition and tissue quantification of HCV RNA in the differential diagnosis between acute rejection and viral recurrence in liver transplant recipients. Secondary objectives were: to evaluate the association between C4d deposition and epidemiological, clinical, laboratorial, and histological features of acute rejection and chronic hepatitis; and to evaluate the association between tissue quantification of HCV RNA and epidemiological, clinical, laboratorial and histological features of chronic hepatitis. **METHODS:** A retrospective diagnostic study was performed with liver biopsy samples. Specimens were selected based on histological diagnosis, and divided into four groups: acute rejection in patients transplanted for HCV (group I), HCV recurrence without rejection (group II), acute rejection in patients transplanted for conditions other than HCV (group III), and non-transplanted chronic HCV (group IV). Patients' charts were reviewed and laboratorial data were collected in order to obtain demographic, clinical and laboratorial data. Samples were stained for C4d with quantitative grading of compartments (portal area, hepatic sinusoids and centrilobular) and were submitted to HCV RNA quantification. The following outcomes were compared among groups: C4d quantitative tissue staining and tissue HCV RNA quantification. **RESULTS:** Twenty-eight cases were included in group I, 25 cases in group II, 20 cases in group III, and 25 cases in group IV. The main compartment of deposition was portal, with intense staining in group IV, with statistical difference compared to all other groups ($p=0,002$). Portal C4d presented intense correlation with periportal inflammation. There was no statistical difference in C4d quantification between rejection and recurrence groups among patients transplanted for HCV. Tissue HCV RNA quantification was higher in hepatitis C recurrence samples compared to acute rejection samples ($p<0,001$), and there was significant correlation with serum HCV RNA quantification and with time of biopsy after transplantation. Area under ROC curve was 0,818 for tissue HCV RNA quantification, and with a cutpoint of 58,15 IU/ml, the test presented sensitivity of 70% for the diagnosis of disease recurrence, specificity of 89%, and positive and negative predictive values of 84% and 78%, respectively. **CONCLUSIONS:** Although there was no difference in C4d quantification between acute rejection and viral recurrence groups in patients transplanted for HCV, there was intense portal C4d deposition in non-transplanted chronic hepatitis C cases. Correlation

was found between portal C4d and periportal inflammation grading. Tissue HCV RNA quantification was statistically higher in disease recurrence group compared to acute rejection, and this test is a potential diagnostic test for this differential diagnosis.

Descriptors: 1. Hepatitis C 2. Liver transplantation 3. Recurrence 4. Rejection 5. Complement C4d 6. Polymerase chain reaction

1 Introdução

Doença hepática avançada causada pelo vírus da hepatite C (VHC) é a principal causa de indicação de transplante de fígado ¹. No entanto, mais da metade dos casos apresenta recidiva histológica em até um ano ². A biópsia hepática tem importante papel no diagnóstico da recidiva e na orientação do manejo, porém o diagnóstico diferencial com rejeição pode ser difícil ³⁻⁶. O marcador tecidual C4d e a PCR quantitativa para o VHC têm sido propostos como métodos auxiliares nessa diferenciação diagnóstica ⁷⁻¹⁴.

1.1 O vírus da hepatite C e o transplante de fígado

Em 1999, a Organização Mundial de Saúde estimou que há cerca de 170 milhões de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) no mundo. A infecção tem caráter universal e sua prevalência varia, com taxas de 1,03% na Europa a 5,3% na África ¹⁵. No Brasil, um inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia revelou que, dos 1.173.406 doadores de sangue avaliados, 14.527 (1,23%) possuíam sorologia positiva para o VHC ¹⁶.

Doença hepática avançada causada pelo VHC, na forma de cirrose ou carcinoma hepatocelular, é atualmente a principal causa de indicação de transplante de fígado no mundo ¹.

A detecção de ácido ribonucleico (RNA) do VHC no soro ou no enxerto após o transplante é praticamente universal, sendo observada em mais de 95% dos casos e definidora de reinfecção ^{2, 17}. Recidiva da hepatite pelo VHC refere-se à presença de lesões histológicas no indivíduo com reinfecção, com progressão para cirrose em aproximadamente 30% dos casos em 5 anos ^{17, 18}.

A recidiva histológica pode se apresentar como hepatite aguda, hepatite colestática progressiva ou hepatite crônica. Hepatite aguda geralmente ocorre entre um e seis meses após o transplante de fígado, em aproximadamente 70% dos casos e, diferentemente do que ocorre em indivíduos imunocompetentes, resolução espontânea é raramente observada. Em cerca de 10% dos casos, pode-se encontrar hepatite colestática progressiva grave entre um e três meses após o transplante ¹. Hepatite crônica ocorre em 70 a 90% dos pacientes em até um ano pós-transplante, e em 90 a 95% em até 5 anos, com um risco de cirrose pós-transplante entre 10 e 30% em 5 anos ¹⁹. A progressão de doença hepática por VHC é particularmente agressiva em pacientes transplantados, com evolução da fibrose mais rápida (cirrose em 9 a 12 anos) comparando-se com pacientes imunocompetentes (média 20 anos) ².

Os aspectos histológicos da recidiva da hepatite no enxerto são geralmente similares àqueles encontrados no fígado não-transplantado ²⁰. A esteatose é usualmente um achado inespecífico precoce. O encontro de necrose focal de hepatócitos, desarranjo lobular e hipertrofia de células de Kupffer são elementos sugestivos de recidiva do vírus. Alterações mais

tardias incluem inflamação mononuclear portal com atividade de interface variável, e lesões de ductos biliares de baixo grau, que podem significar a transição de hepatite aguda para crônica. A hepatite crônica é caracterizada histologicamente por inflamação portal mononuclear, freqüentemente organizada em agregados nodulares e lesão de ducto biliar leve ²¹. Cronologicamente, podem-se reconhecer três estágios: a infecção precoce (0-2 meses), associada a alterações leves inespecíficas; a infecção estabelecida (2-4 meses), associada a hepatite aguda; lesões progressivas (> 6 meses), associadas a hepatite crônica ²⁰. Em biópsias precoces pós-transplante, achados histológicos como atividade necroinflamatória (periportal ou lobular), esteatose macrovesicular e balonização de hepatócitos e/ou colestase proeminentes podem predizer comportamento mais agressivo da doença ²⁰.

Os fatores que estão associados à gravidade de recidiva da hepatite C pós-transplante são: idade avançada do doador, tratamento para rejeição celular aguda com pulsoterapia de corticosteróides ou administração de OKT3, infecção por citomegalovírus, e “mismatch” HLA ²⁰.

1.2 Diagnóstico diferencial entre recidiva de hepatite C e rejeição celular aguda

No seguimento do paciente transplantado por VHC, o aumento de transaminases pode sugerir recidiva da doença, porém representa uma

alteração inespecífica, que pode também estar associada a rejeição, obstrução biliar, isquemia, reação a droga, e outras infecções virais^{9, 17}. Dentre esses, o principal diagnóstico diferencial é o de rejeição. Visto que as abordagens destas duas situações são diferentes, podendo resultar em efeitos deletérios em caso de diagnóstico errôneo, sua diferenciação é de grande importância.

A análise histológica representa o padrão-ouro para o diagnóstico de rejeição aguda e de recidiva de hepatite C pós-transplante, porém a distinção é difícil em algumas ocasiões, visto que as alterações podem ser similares³⁻⁶. Casos de recidiva de hepatite geralmente ocorrem no primeiro ano pós-transplante, há inflamação portal formada por células linfocitárias na maioria dos casos, poucos eosinófilos, esteatose está frequentemente presente, e podem ocorrer lesões de ductos biliares em aproximadamente 50% dos casos. Rejeição aguda geralmente ocorre nos dois primeiros meses pós-transplante, sempre há inflamação portal com infiltrado misto ou predominantemente linfocitário, esteatose nunca está presente, e comumente há lesões de ductos biliares.

Um estudo retrospectivo de Demetris et al.²¹ analisou a acurácia das alterações histológicas nos diagnósticos de rejeição e recidiva por VHC. Nesse estudo, a rejeição foi superestimada em casos com recidiva viral concomitante, em que havia presença de lesão de ductos biliares ou inflamação perivenular envolvendo menos de 50% dos ductos ou veias centrolobulares.

Estudo de Regev et al.⁴ avaliou a concordância inter-observador e intra-observador de 5 patologistas com relação a 102 amostras de biópsias hepáticas de rejeição aguda e recidiva por VHC no primeiro ano após o transplante. O estudo verificou baixas taxas de concordância inter-observador ($\kappa = 0,20$) e intra-observador ($\kappa = 0,19$). Em somente 22% dos casos de diagnóstico de recidiva de VHC e em 9% dos casos de rejeição aguda houve concordância entre 4 patologistas, e em somente 5% dos casos de recidiva de VHC e 2% dos casos de rejeição aguda houve concordância entre os 5 patologistas⁴.

Há trabalhos na literatura que estudaram o papel do produto de degradação do sistema complemento C4d e a PCR quantitativa de VHC no diagnóstico diferencial entre rejeição e recidiva de hepatite⁷⁻¹⁴.

1.3 C4d

Existem 3 formas de reconhecimento imunológico específico que iniciam a rejeição ao enxerto: imunidade celular (células T), humoral (anticorpos) e inata (células “natural killer”) ²². A rejeição celular aguda é causada por infiltrado inflamatório portal predominantemente formado por células T ²³, e é a forma de rejeição mais estudada. A ativação de elementos do sistema imune inato, desencadeada como consequência de lesão tecidual, inicia e amplifica a resposta adaptativa ²⁴.

A rejeição mediada por anticorpos é causada pela presença de anticorpos anti-moléculas de antígeno leucocitário humano (“human leukocyte antigen” ou HLA) específicas do doador, isoaglutininas do sistema ABO de grupo sanguíneo, ou antígenos de células endoteliais ²⁵. O mecanismo principal de lesão desta forma de rejeição é anticorpo-dependente, e é mediada pela ativação da via clássica do sistema complemento. As células T também exercem papel na rejeição humoral, através da iniciação e manutenção de respostas primária e de células B de memória que resultam na produção de plasmócitos e anticorpos.

A via clássica do complemento se inicia quando anticorpos IgG ou IgM se ligam a moléculas-alvo específicas no tecido ^{26, 27} (Figura 1). Esses anticorpos disparam a ativação de C1q, que por sua vez ativa C1r e C1s, que clivam C4, resultando em C4b. O C4b promove a ativação de C3 e progressão para C5b-9, que lisa as células-alvo. Após a ativação de C4 e sua degradação em C4d, os grupos tioéster são expostos, permitindo a ligação covalente à superfície da célula endotelial e a componentes extracelulares da matriz da membrana basal vascular, que persiste em sítios de ativação de C4. A detecção imunohistoquímica de C4d é, portanto, um marcador de imunocomplexo e/ou deposição de anticorpos e, conseqüentemente, de resposta imune humoral. A ativação do C4 também ocorre pela via das lectinas e da proteína C reativa, mas não pela via alternativa.

Figura 1 - As vias de ativação do sistema complemento. Traduzido e adaptado de Dunkelberger e Song²⁸

O C4d tem adquirido papel significativo no diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos no transplante renal^{22, 29}, em que a sua deposição pós-transplante é associada à presença de anticorpos circulantes específicos aos antígenos HLA de classe I ou II dos doadores. É considerado atualmente o melhor marcador de fixação de anticorpos circulantes no endotélio.

1.3.1 Rejeição humoral no transplante de fígado

Tradicionalmente, o fígado era considerado um órgão resistente à rejeição mediada por anticorpos, e essa forma de rejeição era relacionada

apenas aos quadros hiperagudos nos primeiros dias após o transplante. Porém, diversos estudos demonstraram a presença de mecanismos humorais induzidos por anticorpos na patogenicidade de rejeição aguda em transplante de fígado ³⁰⁻³⁶.

Um dos primeiros estudos foi o de Takakura et al. ³⁰. Neste estudo, os autores investigaram a relevância da imunidade humoral em rejeição celular aguda através de “crossmatch” por citometria de fluxo após transplante com doadores vivos, e detectaram presença de anticorpos concomitante ou previamente a rejeição em 13 de 23 episódios de rejeição celular aguda. Os autores observaram menos episódios de rejeição em pacientes submetidos a transplante de fígado com “crossmatch” negativo pré-transplante. O mesmo grupo demonstrou que transplantados de doador vivo apresentavam rejeição aguda precoce quando da presença de anticorpos anti-células T do doador ³⁷.

Krukemeyer et al. ³³, ao compararem biópsias de rejeição aguda e biópsias pré-transplante de fígado, demonstraram maior quantidade de linfócitos B CD20+ e plasmócitos CD138+ nas amostras de rejeição, com presença da citocina MIP-3 α e de seu receptor CCR-6 nos infiltrados portais, sugerindo seu envolvimento no recrutamento de linfócitos B em rejeição aguda. O C4d foi positivo nos 5 casos em que foi realizada detecção com imunohistoquímica deste marcador. Essas 5 amostras mostraram intensa inflamação portal, sugerindo que as células B e os plasmócitos estivessem envolvidos na destruição celular através de resposta humoral. Não havia caso com diagnóstico de hepatite C nesse estudo.

No estudo de Dankof et al.³², o mesmo grupo analisou a presença de C4d e C3d como marcadores de envolvimento de mecanismos humorais pós-transplante de fígado. Dentre as 35 amostras de biópsia hepática analisadas, 22 tinham diagnóstico histológico de rejeição celular aguda, e 13 formavam o grupo comparativo. Desses pacientes, 8 tinham infecção pelo VHC, tendo sido incluídos por possuírem diagnóstico histológico de rejeição, sem sinais histológicos de recidiva do vírus. Das 22 biópsias com diagnóstico de rejeição celular aguda, 3 mostraram positividade difusa, e 8 focal, sendo que o C4d foi encontrado ligado às células endoteliais de artérias e capilares portais, sem depósito em veias hepáticas ou endotélio sinusoidal. Nenhuma das 13 biópsias do grupo controle apresentou C4d positivo. Portanto, comparando-se as biópsias com rejeição e os controles, houve diferença significativa na positividade de C4d ($p= 0.013$). Não houve correlação com o grau de rejeição. Também não houve diferença entre o tempo de transplante dos grupos com C4d positivo ou negativo.

No estudo de Sawada et al.³¹, ao comparar as alterações histológicas nos lóbulos hepáticos com aquelas de áreas portais em casos de rejeição aguda, foi também analisado retrospectivamente o papel da resposta imune humoral através de imunohistoquímica, utilizando C4d. Trinta e cinco amostras de biópsia hepática de 20 pacientes foram divididas em 3 grupos de acordo com a classificação de rejeição de Banff: leve ($n=16$), moderada ($n=14$) e grave ($n=5$). Dentre esses pacientes não havia caso de hepatite C. Quanto ao C4d, foi observado que, em casos de rejeição moderada a grave, a deposição ocorreu tanto nos lóbulos hepáticos quanto nas áreas portais,

com maior intensidade em rejeição grave. Em áreas portais, a deposição de C4d ocorreu no endotélio de veia porta e artéria hepática, e nos lóbulos hepáticos, nos sinusóides. Os autores sugeriram que a resposta humoral tem um papel na rejeição, e que o grau dessa resposta se correlaciona com a gravidade.

Bu et al.³⁴ realizaram estudo imunohistoquímico de 39 amostras de biópsia hepática em 20 pacientes. Foi encontrada deposição de C4d em 69,2% das amostras de pacientes com rejeição aguda, em 33% das amostras de pacientes com recidiva de hepatite B após transplante de fígado, e 28,6% das amostras de não-transplantados com hepatite B crônica. Nos casos de rejeição, a deposição de C4d foi localizada em paredes vasculares de áreas portais e paredes de sinusóides hepáticos.

Em anos mais recentes, a presença de C4d tem sido correlacionada com a presença de anticorpos específicos contra HLA do doador. A prova cruzada ou “crossmatch” do HLA é atualmente realizada obrigatoriamente em transplantes de rim, coração e pulmão. Em 1981, Starzl et al.³⁸ demonstraram que o “crossmatch” positivo não era contra-indicação para o sucesso do transplante de fígado. Em 1995, um estudo com 158 transplantes de fígado mostrou que o “crossmatch” positivo não resultava em efeito deletério na sobrevida do enxerto³⁹. Em 2005, Muro et al.⁴⁰ estudaram 268 transplantes de fígado, e demonstraram pior sobrevida do enxerto naqueles com “crossmatch” positivo ($p=0,0016$). Desde então, mais trabalhos foram publicados demonstrando que a presença de anticorpos antidoador estava associada à menor sobrevida do enxerto^{41, 42}.

Um estudo analisou a correlação de “crossmatch” negativo ou positivo pré-transplante com a deposição de C4d ³⁵ em 764 biópsias de receptores. Os autores demonstraram que a deposição extensa de C4d pode estar associada a rejeição humoral e a pior prognóstico do enxerto. Nos pacientes com “crossmatch” negativo e em biópsias após menos do que 90 dias do transplante, não houve diferença entre a positividade de C4d nos pacientes com rejeição moderada a grave (12/34 casos – 35%) e naqueles com hepatite C crônica (3/9 casos – 33%). Dentre aqueles com “crossmatch” positivo, houve positividade em 9/11 casos (82%), sendo 2 casos em pacientes com VHC, comparados com 61/182 casos (33%) no grupo de “crossmatch” negativo.

Ainda em 2007, Bellamy et al. ⁴³ analisaram retrospectivamente amostras de biópsia hepática com diagnósticos variados e realizaram imunohistoquímica para C4d. Foi encontrada positividade em 3 de 12 biópsias precoces protocolares de pacientes com “crossmatch” positivo, 2/16 casos de rejeição aguda, 3/14 casos de necroinflamação centrolobular, 3/11 casos de obstrução biliar, 3/13 casos de rejeição crônica, e em 1/10 casos de disfunção primária do enxerto.

No último ano, diversos trabalhos estudaram a rejeição humoral através da deposição de C4d e correlação com presença de anticorpos específicos contra o doador. Aguilera et al. ⁴⁴ avaliaram amostras de biópsia hepática de 8 pacientes com o diagnóstico de hepatite autoimune “de novo”, uma forma de disfunção tardia do enxerto em indivíduos sem hepatite autoimune pré-transplante. Os autores estudaram a deposição de C4d e

correlacionaram com a presença de anticorpos não-HLA contra a enzima glutathione S-transferase (GSTT1) do doador. A deposição de C4d foi positiva no compartimento portal em 7 casos, e ausente nos controles de rejeição crônica e recidiva de VHC.

O trabalho de Kozlowski et al.⁴⁵ pesquisou de forma prospectiva a presença de anticorpos antidoador e, naqueles com “crossmatch” positivo persistente, foi realizada imunohistoquímica para detecção de C4d. Em aproximadamente 10% (19/197) dos pacientes, o “crossmatch” foi positivo, porém 15 converteram para “crossmatch” negativo até a 6ª semana pós-transplante. Nos 4 casos restantes, em 3 houve positividade de C4d em endotélio sinusoidal, com alterações morfológicas descritas para rejeição humoral, tais como proliferação de pequenos ductos biliares, balonização de hepatócitos, acúmulo sinusoidal de neutrófilos e colestase hepatocanalicular.

No estudo de Musat et al.⁴⁶, 43 amostras não-consecutivas de biópsia hepática que haviam sido submetidas a imunohistoquímica para C4d e cujos “crossmatch” haviam sido realizados foram retrospectivamente analisadas. Em 40% houve deposição difusa de C4d portal, com maior frequência de episódios de rejeição celular aguda nesse grupo (88%), comparado com o grupo de “crossmatch” positivo ou C4d focal/ausente (50%, $p=0,02$).

Lunz et al.³⁶ analisaram o “crossmatch” de 809 receptores de transplante de fígado, e verificaram forte correlação entre a positividade de C4d endotelial, rejeição celular e “crossmatch” positivo nas primeiras três

semanas pós-transplante. Não houve correlação entre positividade de C4d endotelial e graduação da rejeição ou resposta ao tratamento.

1.3.2 C4d na diferenciação entre rejeição e recidiva de VHC

Existem quatro estudos publicados que avaliaram C4d tecidual na diferenciação entre rejeição e recidiva do VHC ⁷⁻¹⁰.

Schmeding et al. ⁹ fizeram uma análise retrospectiva de 97 pacientes submetidos a biópsia hepática, divididos em 3 grupos: o primeiro grupo consistia em 34 pacientes com diagnóstico de rejeição aguda, incluindo 9 pacientes com hepatite C; o segundo grupo consistia em 34 pacientes com confirmação histológica de recidiva de hepatite C; e o terceiro grupo compreendia 29 pacientes sem hepatite C que foram submetidos a biópsias protocolares, sem suspeita clínica ou histológica de rejeição aguda ou crônica. Foram excluídos os pacientes que tiveram episódios de rejeição aguda nos 6 meses que precederam a biópsia. A positividade de C4d em pacientes com diagnóstico histológico de rejeição aguda foi de 67,7% (23/34), comparado com 11,8% (4/34 – desses, 3 com uso prévio de terapia com interferon por recidiva prévia de hepatite C) nos pacientes com diagnóstico histológico de recidiva da hepatite C ($p<0,001$), e 6,9% nos controles ($p<0,001$), sem correlação entre intensidade de C4d e gravidade de rejeição. No grupo de pacientes com rejeição, 9 haviam sido transplantados por hepatite C, e desses o C4d foi positivo em 6 pacientes. O C4d como marcador positivo de rejeição aguda demonstrou sensibilidade de 67,7% e especificidade de 90,5%. O valor preditivo positivo para rejeição foi

de 75,2%, e o valor preditivo negativo de 86,8%, com valor de área sob a curva de 0,791 (IC 95% de 0,696-0,867).

Os mesmos autores desenvolveram um estudo prospectivo com 91 amostras de tecido congelado com detecção de C4d através da técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático ou “Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay”) ¹⁰. A concentração de C4d foi determinada como a quantidade de C4d dividido pela quantidade de proteínas totais de cada amostra. O quociente total foi de 0,083 em 16 amostras de pacientes com rejeição celular aguda, 0,138 em 15 amostras de pacientes com recidiva de VHC, e 0,135 em 57 amostras de controle. Não foi encontrada diferença estatística entre os quocientes dos grupos ($p > 0.05$), e nem correlação com a gravidade da rejeição no primeiro grupo.

O estudo de Jain et al. ⁷ analisou retrospectivamente 10 pacientes, identificando a distribuição de linfócitos T CD4+, CD8+, CD56+, e depósito de C4d nos infiltrados linfocíticos em 10 amostras de biópsia hepática: 5 com diagnóstico definitivo de rejeição aguda (RNA VHC negativo, e má adesão à terapia imunossupressora documentada com níveis de imunossupressão baixos ou indetectáveis), e 5 com diagnóstico definitivo de recidiva de hepatite C (alta carga viral de VHC, disfunção hepática, aderentes à terapia imunossupressora, níveis adequados de medicações imunossupressoras). Através de reação imunohistoquímica, foi realizada graduação semi-quantitativa de C4d em hepatócitos: graus 0 ou 1 – sem marcação ou marcação mínima; grau 2 – marcação moderada; grau 3 – marcação forte. Não houve depósito de C4d no endotélio de pequenos vasos em nenhum

dos grupos, e houve marcação moderada a forte em todos os pacientes com diagnóstico de rejeição aguda exceto em um paciente que havia recebido terapia com anticorpo anti-timócito policlonal; nos pacientes com recidiva de hepatite C, foi observada nenhuma ou mínima marcação com C4d.

Lorho et al.⁸ analisaram 36 biópsias hepáticas de 34 pacientes transplantados por cirrose alcoólica (17/34), hepatite C (14/34) e outros (3/34). As biópsias foram submetidas a análise histológica e análise imunohistoquímica com anticorpos anti-C4d. A expressão de C4d em células endoteliais sinusoidais foi avaliada de forma semiquantitativa: negativa (-), positiva em menos da metade (+/-), ou positiva em mais da metade (+). De acordo com a análise histológica, as amostras foram classificadas em 6 grupos: normal (14), rejeição aguda (9), rejeição crônica (2), recidiva de hepatite C (5), indeterminado – rejeição ou recidiva de hepatite C (2), e outros (4). A positividade de C4d ocorreu em 14% no grupo classificado como histologia normal, 33% no grupo rejeição aguda, 100% no grupo rejeição crônica, e 25% no grupo outros. No grupo indeterminado, não houve deposição de C4d, e a evolução clínica dos dois pacientes permitiu demonstrar posteriormente que ambos se tratavam de recidiva de hepatite C.

1.4 PCR quantitativa do VHC tecidual

A quantificação de PCR de VHC em tecido hepático tem sido realizada em alguns estudos ⁴⁷⁻⁵⁴.

Terrault et al. ⁵⁴ realizaram o teste em amostras congeladas de 20 explantes de indivíduos transplantados por VHC, e encontraram 95% de sensibilidade e 100% de especificidade do método.

Além disso, há estudos que avaliaram a correlação entre a quantificação de RNA de VHC em tecido com a do soro ^{51, 52}. O trabalho de Negro et al. ⁵² avaliou 44 biópsias de 23 pacientes transplantados, e detectou positividade em 42 amostras, correlacionadas com a presença de antígeno de VHC no tecido em 21/21 amostras, e sem correlação com a PCR de VHC sérica ou graduação histológica da hepatite. Estudo de Martín et al. ⁵¹, entretanto, encontrou correlação entre os níveis de RNA teciduais e séricos ($r=0,76$, $p<0,001$).

Alguns estudos avaliaram a PCR como marcador de resposta ao tratamento com interferon e ribavirina, na população não-transplantada. Um dos primeiros estudos foi o de Hasui et al. ⁵⁰, que analisou a PCR sérica e tecidual de 16 pacientes, com bom desempenho da PCR tecidual em prever resposta bioquímica. Sugano et al. ⁵³ observaram que níveis indetectáveis de RNA hepáticos e séricos foram associados a predição de resposta virológica sustentada nos pacientes tratados. Ballardini et al. ⁴⁷ encontraram níveis maiores de RNA tecidual em não-respondedores.

Gervais et al.⁴⁸ avaliaram a correlação de RNA de VHC tecidual com alterações histológicas, genótipo viral e resposta ao tratamento em 43 pacientes. Os autores encontraram correlação entre o genótipo 1 e altos níveis de RNA de VHC tecidual ($p=0,05$), e entre menores níveis pré-tratamento e indivíduos com resposta virológica sustentada ($p=0,0002$), sem correlação com as alterações histológicas encontradas.

Em transplante de fígado, Guerrero et al.⁴⁹ avaliaram amostras de biópsia hepática pós-transplante para determinar o momento da reinfecção tecidual em 14 pacientes. O tempo de reinfecção tecidual variou de 5 dias a 144 semanas pós-transplante, com alterações morfológicas indeterminadas, de hepatite lobular ou sem histologia sugestiva de recidiva viral. Svoboda-Newman et al. avaliaram 35 amostras de tecido hepático pós-transplante por VHC, com sensibilidade de 98% da PCR tecidual para detecção da presença de RNA⁵⁵. Nuovo et al.⁵⁶ encontraram correlação entre alta viremias de VHC e detecção hepática de RNA viral pós-transplante.

1.4.1 PCR quantitativa do VHC tecidual no diagnóstico diferencial entre recidiva e rejeição aguda

Com o objetivo de diferenciação entre os diagnósticos de recidiva de VHC e rejeição, Fragulidis et al. realizaram a detecção qualitativa do RNA de VHC em tecido hepático em 17 indivíduos transplantados por VHC, e em 8 controles transplantados por outras doenças¹³. As biópsias foram realizadas em média 6 meses pós-transplante. Em 9 pacientes do grupo com VHC, a PCR no tecido foi positiva, e a evolução clínica foi compatível com recidiva

de VHC em todos os casos. Desses 9 pacientes, o diagnóstico histológico havia sido de rejeição aguda inicialmente. Nos 8 pacientes restantes do grupo com VHC, não foi detectado RNA de VHC no tecido, e apesar de 4 terem recebido o diagnóstico histológico de recidiva de VHC, a evolução clínica foi compatível com rejeição (melhora de transaminases com o aumento da imunossupressão).

Um estudo retrospectivo analisou dados clínicos e histológicos de 26 pacientes no pós-transplante por VHC ¹¹, submetidos a biópsia hepática em 4 momentos diferentes (na primeira semana pós-transplante ou do doador, 3 meses antes da suspeita de recidiva de VHC, no momento da suspeita da recidiva, e 3 meses após), e fez a correlação com a quantificação de RNA de VHC no tecido hepático em cada momento. Os autores encontraram maior grau de correlação de altos níveis de RNA de VHC com o diagnóstico de hepatite lobular, seguido pelos diagnósticos de inflamação inespecífica, infecção por citomegalovírus, hepatite crônica e rejeição celular aguda ($p = 0,0002$). Dentre os aspectos histológicos, as características que estiveram mais comumente associadas a altos níveis de RNA foram inflamação portal e presença de corpúsculos acidófilos, sem correlação com aspectos histológicos de rejeição.

Gottschlich et al. ¹⁴ realizaram um estudo com o objetivo de determinar o papel dos níveis de RNA de VHC hepáticos na diferenciação entre rejeição celular aguda e recidiva de hepatite por VHC. Foram analisadas as amostras de biópsia hepática e evolução clínica de 36 pacientes. Setenta e duas amostras foram alocadas a um de 5 grupos de

acordo com os achados histológicos e resposta à intervenção clínica: rejeição definitiva, rejeição provável, indeterminado, recidiva de VHC provável, e recidiva de VHC definitiva. Houve diferença significativa na quantidade de RNA entre os grupos de rejeição definitiva e recidiva de VHC definitiva, entre os grupos VHC provável e rejeição provável, e entre os grupos VHC provável e indeterminado. Esse estudo permitiu concluir que houve níveis hepáticos de RNA teciduais estatisticamente maiores em pacientes com recidiva de VHC comparando-se com pacientes com rejeição, porém com sobreposição de valores, e que pacientes com níveis baixos de RNA provavelmente não têm recidiva por VHC.

Em estudo mais recente, D'Errico-Grigioni et al.¹² avaliaram retrospectivamente 65 pacientes submetidos à primeira biópsia pós-transplante de fígado por cirrose por VHC, e realizaram a quantificação de RNA de VHC com PCR em tempo real em material parafinado e detecção imunohistoquímica *in situ* de proteínas estruturais e não-estruturais de VHC. Havia 52 pacientes com diagnóstico histológico de recidiva de VHC e 13 pacientes com diagnóstico de rejeição aguda ou outros diagnósticos. Os resultados mostraram que ambas as técnicas foram eficazes no diagnóstico diferencial entre casos de recidiva e casos sem recidiva.

1.5 Outros marcadores na diferenciação entre rejeição e recidiva de VHC

Um estudo com 215 amostras de biópsia hepática pós-transplante de fígado por VHC analisou a presença de antígeno do vírus através de imunohistoquímica em espécimes congelados ⁵⁷, e encontrou maior frequência de positividade em amostras com diagnóstico histológico de recidiva comparado às de rejeição (89% versus 59%; $p < 0.0001$), com significativamente maior porcentagem de hepatócitos positivos (40% versus 1%; $p < 0.00001$). A detecção de antígenos foi particularmente útil no período até 6 meses pós-transplante.

Um estudo com 97 pacientes analisou de forma seriada a presença de RNA de VHC sérico, detecção de IgM anti-VHC e correlação com diagnóstico histológico a cada aumento de pelo menos duas vezes o valor basal ou normal de ALT ⁵⁸. Os resultados mostraram que os valores de IgM anti-VHC foram significativamente maiores em recidiva de VHC comparados aos dos casos de rejeição ($p=0,014$), e que o aumento no valor de IgM anti-VHC (negativo para positivo ou variação $> 0,18$) teve alta acurácia no diagnóstico, identificando recidiva de VHC com 100% de especificidade.

1.6 Justificativa

Tendo em vista a presença de dificuldades na discriminação entre rejeição aguda e recidiva de hepatite C e o potencial papel dos marcadores teciduais C4d e PCR quantitativa de VHC nesse diagnóstico diferencial, o presente estudo foi realizado.

2 Objetivos

Objetivo primário:

Avaliar o papel da deposição de C4d e da PCR quantitativa de VHC teciduais no diagnóstico diferencial entre rejeição aguda e recidiva de hepatite C em pacientes transplantados de fígado.

Objetivos secundários:

1. Avaliar a associação de deposição de C4d com as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e histológicas de rejeição aguda e hepatite crônica.
2. Avaliar a associação da PCR quantitativa de VHC tecidual com as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e histológicas de hepatite crônica.

3 Método

3.1 Desenho do estudo

Estudo diagnóstico retrospectivo.

3.2 Casuística

3.2.1 Seleção de casos

O estudo foi realizado com amostras parafinizadas de biópsia hepática de pacientes transplantados e em lista de espera para transplante de fígado no período de 1998 a 2011 no Serviço de Transplante de Fígado Adulto do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), e de pacientes com hepatite C crônica da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP.

O diagnóstico histológico foi considerado o padrão-ouro. Todos os casos selecionados foram submetidos a revisão histológica, para distribuição em um dos quatro seguintes grupos:

Grupo I - rejeição sem recidiva do VHC em pacientes transplantados por VHC (doravante denominado “rejeição em VHC”);

Grupo II - recidiva do VHC sem rejeição em pacientes transplantados por VHC (doravante denominado “recidiva VHC”);

Grupo III (controle) - rejeição em pacientes transplantados sem VHC (doravante denominado “rejeição sem VHC”);

Grupo IV (controle) - hepatite crônica ativa por VHC em não-transplantado (doravante denominado “hepatite crônica não-tx”).

Para a seleção de casos dos grupos I (rejeição em VHC) e II (recidiva VHC), foram identificados os indivíduos transplantados por VHC a partir da lista de transplantes realizados entre 1998 e 2011. Em seguida, foi realizada busca de laudos de biópsia hepática desses indivíduos no sistema informatizado da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. Os casos cujos laudos eram de rejeição aguda ou recidiva pelo VHC foram selecionados para revisão da avaliação histológica.

Para a seleção de casos do grupo III (rejeição sem VHC), foram identificados os indivíduos transplantados por doenças hepáticas não-associadas ao VHC a partir da lista de transplantes realizados entre 1998 e 2011. Em seguida, foi realizada busca de laudos de biópsia hepática no sistema informatizado da Divisão de Laboratório Central DO HCFMUSP. Os casos cujos laudos eram de rejeição aguda foram selecionados para revisão da avaliação histológica.

A seleção de casos do grupo IV (hepatite crônica não-tx) foi realizada de duas maneiras: identificação de indivíduos em lista de transplante por cirrose por VHC em janeiro de 2010; e identificação de indivíduos com retorno agendado no Ambulatório Geral Didático de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias em janeiro de 2010. Em seguida, foi realizada busca de laudos no sistema informatizado da Divisão de Laboratório Central. Os casos cujos laudos eram de hepatite crônica pelo VHC foram selecionados para revisão da avaliação histológica.

Para todos os grupos, a casuística selecionada foi de conveniência, com interrupção da busca de casos ao atingir o número planejado em cada grupo. Nos grupos de transplantados (grupos I, II e III), houve preferência para casos mais recentes. Foram selecionadas somente biópsias até 1 ano após o transplante.

3.2.2 Critérios de inclusão e de exclusão

Após a seleção de casos, foi realizada revisão de lâminas, verificação de dados clínicos e laboratoriais, e aplicados os critérios de inclusão e de exclusão.

Os critérios de inclusão foram:

1. Amostras com 6 ou mais espaços-porta e 4 ou mais vênulas hepáticas terminais.
2. Uma amostra por paciente.
3. Grupo I (rejeição em VHC): presença de rejeição aguda em paciente transplantado com sorologia e PCR sérica de VHC positivas.
4. Grupo II (recidiva VHC): presença de hepatite crônica em paciente transplantado com sorologia e PCR sérica de VHC positivas.
5. Grupo III (rejeição sem VHC): presença de rejeição aguda em paciente transplantado com sorologia de VHC negativa.
6. Grupo IV (hepatite crônica não-tx): presença de hepatite crônica em paciente não-transplantado com sorologia e PCR sérica de VHC positivas.

Os critérios de exclusão foram: em todos os grupos, associação de infecção pelo vírus da hepatite B, hepatite auto-imune, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária e doença de depósito. No grupo de hepatite crônica não-tx, foram excluídos casos com hepatocarcinoma concomitante.

3.3 Dados demográficos, clínicos e laboratoriais

Foi realizada revisão de prontuários e do sistema informatizado da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP para obtenção dos seguintes dados demográficos, clínicos e laboratoriais: idade, gênero, tempo de transplante, tipo de transplante, diagnóstico principal que levou ao transplante, uso de interferon (IFN) pré-transplante (pré-tx) ou pré-biópsia (pré-bx), tempo de isquemia total, presença de RNA do VHC pré-tx, PCR do VHC 6 meses antes ou depois da biópsia, imunossupressão, genótipo do VHC e idade do doador.

3.4 Avaliação histológica

Todas as amostras de biópsia hepática selecionadas foram revisadas por um patologista com experiência em transplante de fígado da Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP, sem conhecimento dos dados clínicos, para alocação a cada um dos grupos.

Todas as amostras foram analisadas na coloração hematoxilina-eosina (HE), Tricômico de Masson, Picro-sirius e Perls.

3.4.1 Critério diagnóstico e classificação de hepatite crônica

O critério histológico para diagnóstico de hepatite crônica, em transplantados e em não-transplantados, foi: presença de graus variáveis de inflamação portal, periportal e lobular, com ou sem graus variáveis de fibrose portal e/ou periportal ⁵⁹.

Foi utilizada a classificação de Ishak modificado (Anexo A) ⁶⁰, que é baseada na avaliação semi-quantitativa de aspectos necro-inflamatórios e de alterações arquiteturais, fibrose e cirrose.

3.4.2 Critério diagnóstico e estadiamento de rejeição aguda

O critério histológico para diagnóstico de rejeição aguda foi a presença de pelo menos dois dos três aspectos a seguir: infiltrado inflamatório portal misto com predomínio de células mononucleares, como linfócitos blásticos, neutrófilos, e eosinófilos; inflamação ou lesão de ductos biliares; inflamação subendotelial de veias portais ou vênulas hepáticas terminais ²³. Foram utilizados os critérios de Banff (Anexos B e C) ²³ para estadiamento e graduação.

3.5 Detecção de C4d em tecido hepático

Todas as amostras foram submetidas a imunohistoquímica para detecção de C4d.

Após corte dos blocos dos casos incluídos, as amostras de 3µm foram fixadas em lâminas silanizadas. A desparafinização foi feita com xilol a 60°C por 30 minutos, e xilol a temperatura ambiente por 10 minutos. As lâminas foram hidratadas em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, seguida de lavagem em água corrente e destilada. O bloqueio de peroxidase endógena foi feito com água oxigenada a 6% por 20 minutos. O desmascaramento de epítomos foi realizado com panela de pressão em tampão de citrato 0.01M pH 6,0, durante 2 minutos. Foi utilizado kit comercial (Biomedica, Wien, Áustria) com anticorpos policlonais de coelho anti-C4d humano diluídos 1:50, com incubação durante uma noite a 4 graus Celsius. A amplificação foi realizada utilizando-se a técnica do complexo polímero-peroxidase (Novolink Max Polymer, Novocastra e Newcastle, Reino Unido). DAB (3,3 diaminobenzidine; DAKO, Denmark) foi o cromógeno para a reação com peroxidase. A contracoloração foi realizada com hematoxilina Harris. Os controles negativos da reação foram obtidos através de omissão do anticorpo primário.

Nos casos de positividade de C4d, foi descrito o compartimento de deposição (portal, sinusoidal e/ou centrolobular), e realizada graduação quantitativa conforme a área estimada de reação positiva em cada

compartimento no aumento de 10 vezes no microscópio óptico, apresentando-se o resultado como proporção de área positiva.

3.6 Quantificação de RNA do VHC em tecido hepático

Foi realizada quantificação de RNA do VHC nos grupos I (rejeição em VHC), II (recidiva VHC) e IV (hepatite crônica não-tx). O “kit” comercial “High Pure RNA Paraffin Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) foi utilizado para a extração do HCV-RNA.

Para a desparafinização, amostras de 10µm de tecido parafinado foram colocadas em banho de xileno por 10 minutos, seguido por dois banhos de etanol absoluto de 10 minutos cada com troca da solução. Na seqüência houve secagem do tecido a 55°C por 10 minutos.

Ao tecido desparafinado foram adicionados 100µl tampão de lise, 10µl de SDS (10%) e 40µl de Proteinase K. Após agitação vigorosa, as amostras foram mantidas a 55°C por uma noite. Após este período foram adicionados 325µl de tampão “binding” e 325µl de etanol absoluto a cada tubo. Após agitação leve com a pipeta, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 8.000g e o sobrenadante descartado, com uma repetição desta operação. O material foi então submetido a lavagem com 500µl de tampão de lavagem I no compartimento acima do filtro e centrifugado por 15 segundos a 8.000g, com descarte do sobrenadante. A operação foi repetida duas vezes com o tampão de lavagem II, seguida por centrifugação por 2

minutos no máximo de velocidade para secagem. Foram trocados os tubos de suporte da coluna de filtro e adicionado 90µl de tampão de eluição a cada tubo, seguido por centrifugação de 1 minuto a 8000g. A essa solução foram adicionados 10µl de tampão de incubação DNase, 1µl de DNase e 1,5µl de QS, seguido por um período de incubação a 37°C por 45 minutos. Finalizado o período de incubação foram adicionados 20µl de tampão de lise de tecido, 18µl de SDS (10%) e 40µl de solução de Proteinase K, a mistura foi homogeneizada com agitação rápida e vigorosa, seguida por incubação a 55°C por 1 hora. Após este período foram adicionados 325µl de tampão “binding” e 325 de etanol absoluto a mistura que foi homogeneizada com agitação leve e o volume transferido para um novo tubo com filtro. Na sequência as amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 8.000g e o líquido sobrenadante descartado, com uma repetição desta operação para secagem completa do filtro. O material foi submetido a lavagem com 500µl de tampão de lavagem I no compartimento acima do filtro e centrifugado por 15 segundos a 8.000g, com descarte do sobrenadante. A operação foi repetida duas vezes com o tampão de lavagem II, seguida por centrifugação por 2 minutos no máximo de velocidade para secagem. Os tubos suporte da coluna de filtro foram trocados e adicionados 50µl de tampão de eluição a cada tubo, a solução foi mantida a temperatura ambiente por 1 minuto, e posteriormente submetida a centrifugação por 1 minuto a 8000g. Os microtubos agora contêm RNA eluído que foram mantidos a 80°C negativos até o momento da realização da amplificação do HCV-RNA.

Foi realizado ensaio de amplificação em tempo real para detecção quantitativa de RNA do VHC através do kit comercial COBAS® TaqMan® HCV Test (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Foram utilizados, para a transcrição reversa (RT) e amplificação pela PCR, iniciadores que definem uma sequência dentro da região 5' não traduzida altamente conservada do genoma do HCV para todos os genótipos. A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas proporcionou a detecção em tempo real da acumulação de produtos da PCR ao monitorar a intensidade de emissão de corantes sinalizadores fluorescentes libertados durante o processo de amplificação.

Para cada 24 testes, foram adicionados 170µL de solução de manganês (CTM Mn²⁺) no frasco de Master Mix HCV, e esta solução (Master Mix preparado) foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos, protegida da luz. O reagente Master Mix contém pares de “primers” e sondas específicas para RNA de VHC e para RNA de VHC padrão (“quantitation standard” ou QS), resultando em amplicons com identificações independentes. O QS foi adicionado na fase de extração.

Foram pipetados 50µL de Master Mix preparado no tubo K, e adicionados 50µL das amostras e controles de RNA eluído, misturando a solução com micropipeta levemente por 3 vezes.

Foi utilizado o analisador Cobas TaqMan 48 (CTM 48, Roche Molecular Systems), com o software Amplilink, versão 3.2 (Roche Diagnostics). O analisador calculou os títulos das amostras e controles através da comparação do sinal de VHC destas com o sinal de VHC do QS.

Os resultados foram expressos em unidades internacionais (UI/ml), de acordo com o “Second WHO International Standard for HCV RNA NAT assays (NIBSC Code 96/798)¹⁰”.

O limite inferior de detecção do teste é de 25UI/ml, e o limite superior é de $3,91 \times 10^8$ UI/ml.

3.7 Desfechos

Os seguintes desfechos foram comparados entre os grupos:

- Quantificação de C4d em tecido hepático;
- Quantificação de RNA de VHC em tecido hepático.

3.8 Tratamento estatístico

3.8.1 Amostra calculada

O tamanho da amostra foi calculado a partir da estimativa de prevalência de positividade de C4d. Foram utilizados dados do estudo de Schmeding et al. ⁹, com 67% de positividade para rejeição aguda, e 12% para recidiva de VHC. O método utilizado para o cálculo do tamanho amostral foi o teste de duas amostras para comparação de proporções, com nível de significância de 0.05 e poder de 0.8. Utilizando-se prevalências de

0.55, 0.6, 0.65, 0.7 e 0.75 entre as rejeições agudas, de 0.05, 0.1, 0.15 e 0.2 entre as recidivas de HCV, foram comparadas todas as combinações possíveis (Anexo D).

De acordo com a disponibilidade de número de casos até um ano após o transplante e inclusão de somente uma biópsia por paciente, como previamente determinado, foi definido que haveria 28 casos em cada um dos grupos principais (I e II), e 22 casos em cada um dos grupos controles (III e IV).

3.8.2 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas segundo grupos com uso de medidas-resumo (média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo). Entre grupos, as variáveis quantitativas sem distribuição normal foram comparadas através do teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas não-paramétricas de Dunn ⁶¹. Para as comparações entre grupos das variáveis com distribuição normal, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido de comparações múltiplas de Tukey para comparação dos grupos dois a dois ⁶¹.

As variáveis qualitativas foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas. Para verificação de diferença entre grupos, foram utilizados o teste de qui-quadrado ou teste da razão de verossimilhanças para as variáveis qualitativas ⁶². Para variáveis com diferença estatisticamente significativa, foram realizadas regressões logísticas para identificação do(s) grupo(s) com diferença estatística ⁶¹.

Para as variáveis qualitativas ordinais foram utilizados testes Mann-Whitney para compará-las entre dois grupos ou testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas não paramétricas para compará-las entre mais de dois grupos ⁶².

Foram calculadas as correlações de Spearman de ambos os marcadores com as variáveis quantitativas e qualitativas ordinais avaliadas ⁶².

Para as variáveis que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) na associação com C4d foi criado um modelo de regressão linear múltipla ⁶¹, para verificar quais variáveis conjuntamente influenciam no resultado. Para a PCR de VHC foi criado um modelo de regressão linear supondo distribuição gama com função de ligação logarítmica com uso de modelos lineares generalizados ⁶³.

Para resultado de C4d e/ou PCR quantitativo de VHC com diferença estatística entre os grupos I (rejeição em VHC) e II (recidiva de VHC), planejou-se o cálculo da curva ROC ("receiving operating characteristic") ⁶⁴ para identificação de ponto de corte que melhor discriminasse os dois diagnósticos, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razões de verossimilhanças positiva e negativa. A interpretação dos testes encontra-se no Anexo E ⁶⁵.

Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%. Desta forma, foram consideradas diferenças significantes aquelas cujos valores foram abaixo de 0,05 ($p < 0,05$). As análises foram realizadas através do programa SPSS 7.5, versão 15.0.

4 Resultados

4.1 Casuística

De janeiro de 1998 a junho de 2011, foram realizados 864 transplantes, sendo 268 por cirrose por VHC. Desses, foram selecionados 103 casos para revisão de lâminas e alocação aos grupos I (rejeição em VHC) e II (recidiva em VHC), e 27 casos para o grupo III (Figura 2). Em janeiro de 2010, a lista de espera do transplante possuía 469 indivíduos, sendo 119 com diagnóstico principal de cirrose por VHC, e o Ambulatório Geral Didático possuía 80 pacientes com retorno agendado naquele mês. Desses, foram selecionados 32 casos para o grupo IV.

Figura 2 - Fluxograma de seleção e distribuição nos grupos

Seis prontuários não foram localizados (4 casos do grupo I e 2 casos do grupo IV), e portanto não tiveram todas as variáveis analisadas.

4.2 Caracterização dos grupos

As descrições das características quantitativas demográficas e do transplante, bem como as comparações entre os grupos, encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Descrição das variáveis quantitativas demográficas e do transplante dos 98 casos - comparação entre os grupos

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Idade (anos)	I - Rejeição em VHC	52,04	8,99	51,5	32	67	28	0,005 ⁽¹⁾
	II - Recidiva VHC	54,00	11,01	56	25	69	25	
	III - Rejeição sem VHC	44,45	13,36	43	21	68	20	
	IV - Hepatite crônica	45,52	10,01	49	22	62	25	
Tempo de tx (dias)	I - Rejeição em VHC	18,29	21,82	10	4	95	28	<0,001 ⁽²⁾
	II - Recidiva VHC	205,52	93,05	197	41	374	25	
	III - Rejeição sem VHC	41,35	65,98	16	4	276	20	
Idade doador (anos)	I - Rejeição em VHC	44,96	11,46	46	22	69	23	0,021 ⁽¹⁾
	II - Recidiva VHC	51,78	15,39	58	16	73	23	
	III - Rejeição sem VHC	40,20	12,72	39,5	19	59	20	
Tempo de isquemia (minutos)	I - Rejeição em VHC	507,25	156,87	520	186	822	24	0,572 ⁽²⁾
	II - Recidiva VHC	458,20	135,00	480	133	640	25	
	III - Rejeição sem VHC	483,95	105,01	464,5	297	753	20	

⁽¹⁾ Teste de ANOVA

⁽²⁾ Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 2 - Comparações múltiplas das variáveis quantitativas demográficas entre os grupos

Variável	Comparação		Diferença média	Erro padrão	p
Idade ⁽¹⁾	I - Rejeição em VHC	II - Recidiva VHC	-1,96	2,96	0,911
	I - Rejeição em VHC	III - Rejeição sem VHC	7,59	3,15	0,083
	I - Rejeição em VHC	IV - Hepatite crônica não-tx	6,52	2,96	0,131
	II - Recidiva VHC	III - Rejeição sem VHC	9,55	3,23	0,020
	II - Recidiva VHC	IV - Hepatite crônica não-tx	8,48	3,04	0,032
	III - Rejeição sem VHC	IV - Hepatite crônica não-tx	-1,07	3,23	0,987
Idade do doador ⁽¹⁾	I - Rejeição em VHC	II - Recidiva VHC	-6,83	3,93	0,199
	I - Rejeição em VHC	III - Rejeição sem VHC	4,76	4,07	0,477
	II - Recidiva VHC -	III - Rejeição sem VHC	11,58	4,07	0,016
Tempo de tx ⁽²⁾	I - Rejeição em VHC	II - Recidiva VHC			<0,001
	I - Rejeição em VHC	III - Rejeição sem VHC			0,311
	II - Recidiva VHC	III - Rejeição sem VHC			<0,001

⁽¹⁾ Teste de Tukey⁽²⁾ Teste de Dunn

A PCR quantitativa do VHC sérica 6 meses antes ou depois da biópsia foi realizada em 12 pacientes do grupo I (rejeição em VHC) e em 16 pacientes do grupo II (recidiva VHC). A média foi de 645924 UI/ml (mínimo de 600 UI/ml, máximo 850000 UI/ml, desvio-padrão 302227 UI/ml).

As descrições das características qualitativas demográficas e do transplante, bem como as comparações entre os grupos, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Descrição das variáveis categóricas dos 98 casos – comparação entre grupos

Variável	Categoria	Grupo										p
		I - Rejeição em VHC		II - Recidiva VHC		III - Rejeição sem VHC		IV - Hepatite crônica não-tx		Total		
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sexo	Masculino	17	60,7	18	72,0	9	45,0	12	48,0	56	57,1	0,216 ⁽¹⁾
	Feminino	11	39,3	7	28,0	11	55,0	13	52,0	42	42,9	
Tipo de tx	cadáver	22	91,7	22	88,0	20	100,0			64	92,8	0,154 ⁽²⁾
	intervivos	0	0,0	2	8,0	0	0,0			2	2,9	
	repique	2	8,3	1	4,0	0	0,0			3	4,3	
IFN prévio	Não	6	27,3	10	40,0			19	82,6	35	50,0	<0,001 ⁽¹⁾
	Sim	16	72,7	15	60,0			4	17,4	35	50,0	
Genótipo	1	13	59,1	17	68,0			14	66,7	44	64,7	0,647 ⁽²⁾
	2	1	4,5	0	0,0			0	0,0	1	1,5	
	3	8	36,4	8	32,0			7	33,3	23	33,8	
MMF/Myfortic	Não	20	83,3	18	72,0	17	85,0			55	79,7	0,491 ⁽²⁾
	Sim	4	16,7	7	28,0	3	15,0			14	20,3	
RNA VHC prétx	Positivo	19	86,4	19	95,0					38	90,5	0,608 ⁽²⁾
	Negativo	3	13,6	1	5,0					4	9,5	
Ano de biópsia	1998 a 2006	15	53,6	7	28,0	8	40,0	19	76,0	49	50,0	0,006 ⁽¹⁾
	2007 a 2011	13	46,4	18	72,0	12	60,0	6	24,0	49	50,0	

⁽¹⁾ Teste qui-quadrado

⁽²⁾ Teste da razão de verossimilhanças

Na análise por regressão logística, o uso de IFN prévio foi mais freqüente nos grupos I (rejeição em VHC) e II (recidiva VHC) em relação ao grupo IV (hepatite crônica não-tx) ($p < 0,001$ e $p = 0,004$, respectivamente). Quanto ao ano em que a biópsia foi realizada, havia maior número de casos biopsiados entre 1998 e 2006 no grupo IV (hepatite crônica não-tx) em relação aos grupos II (recidiva VHC, $p = 0,001$) e III (rejeição sem VHC, $p = 0,017$), e não houve diferença em relação ao grupo II (rejeição em VHC, $p = 0,094$).

O estadiamento e a graduação da rejeição nos 2 grupos de rejeição encontram-se na tabela 4. O estadiamento e a graduação de hepatite nos grupos de recidiva VHC e hepatite crônica não-tx encontram-se na tabela 5.

Tabela 4 - Comparação entre os grupos I (Rejeição em VHC) e III (Rejeição sem VHC) segundo estadiamento e graduação da rejeição

Variável	Graduação	Grupo				Total	p ⁽¹⁾
		I - Rejeição em VHC		III - Rejeição sem VHC			
		n	%	n	%	n	%
Estadiamento rejeição	Leve	10	35,7	5	25,0	15	31,3
	Moderada	12	42,9	11	55,0	23	47,9
	Grave	6	21,4	4	20,0	10	20,8
Rejeição inflamação portal	1	7	25,0	5	25,0	12	25,0
	2	17	60,7	13	65,0	30	62,5
	3	4	14,3	2	10,0	6	12,5
Rejeição lesão ductal	1	11	39,3	11	55,0	22	45,8
	2	14	50,0	7	35,0	21	43,8
	3	3	10,7	2	10,0	5	10,4
Rejeição lesão endotelial	1	8	28,6	5	25,0	13	27,1
	2	16	57,1	13	65,0	29	60,4
	3	4	14,3	2	10,0	6	12,5

⁽¹⁾ Teste da razão de verossimilhanças

Tabela 5 - Comparação entre os grupos II (recidiva VHC) e IV (Hepatite crônica não-tx) segundo a classificação de Ishak

Variável	Graduação	Grupo						p ⁽¹⁾
		II - Recidiva VHC		IV - Hepatite crônica não-tx		Total		
		n	%	n	%		%	
Fibrose portal	0	2	8,0	0	0,0	2	4,0	<0,001
	1	6	24,0	4	16,0	10	20,0	
	2	11	44,0	1	4,0	12	24,0	
	3	6	24,0	5	20,0	11	22,0	
	4	0	0,0	3	12,0	3	6,0	
	5	0	0,0	6	24,0	6	12,0	
	6	0	0,0	6	24,0	6	12,0	
Inflamação portal	1	4	16,0	0	0,0	4	8,0	0,004
	2	14	56,0	9	36,0	23	46,0	
	3	7	28,0	12	48,0	19	38,0	
	4	0	0,0	4	16,0	4	8,0	
Inflamação periportal	1	7	28,0	1	4,0	8	16,0	0,040
	2	9	36,0	8	32,0	17	34,0	
	3	7	28,0	9	36,0	16	32,0	
	4	2	8,0	7	28,0	9	18,0	
Inflamação parenquimatosa confluyente	0	15	60,0	12	48,0	27	54,0	0,368
	1	10	40,0	11	44,0	21	42,0	
	2	0	0,0	1	4,0	1	2,0	
	4	0	0,0	1	4,0	1	2,0	
Inflamação parenquimatosa focal	0	0	0,0	1	4,0	1	2,0	0,654
	1	4	16,0	5	20,0	9	18,0	
	2	17	68,0	15	60,0	32	64,0	
	3	4	16,0	4	16,0	8	16,0	

⁽¹⁾ Teste da razão de verossimilhanças

4.3 C4d

Os resultados das quantificações de C4d dos 98 casos estão demonstrados no anexo F. A deposição de C4d foi mais frequente no compartimento portal comparado à deposição nos compartimentos sinusoidal e centrolobular. Houve positividade de C4d portal em 53,5% (15/28) dos casos do grupo I (rejeição em VHC), 52,0% (13/25) dos casos do grupo II (recidiva VHC), 60% (12/20) dos casos do grupo III (rejeição sem VHC) e 92% (23/25) dos casos do grupo IV (hepatite crônica não-tx). As figuras 3 a 6 ilustram amostras representativas da deposição de C4d.

Figura 3 - Amostra representativa do grupo I (rejeição em VHC) com rejeição leve (Banff 1/1/1) e positividade de C4d no endotélio do espaço porta (aumento 20x)

Figura 4 - Caso do grupo I com rejeição leve (Banff 1/1/1) e positividade de C4d no compartimento centrolobular (aumento 20x)

Figura 5 - Caso de transplante por cirrose alcoólica (grupo III) com rejeição grave (Banff 3/3/3) e positividade de C4d no compartimento centrolobular (aumento 20x).

Figura 6 - Caso do grupo IV – hepatite crônica não-tx com grau de fibrose 3 e atividade periportal 2 com positividade de C4d no espaço porta (aumento 20x)

A tabela 6 apresenta as comparações dos resultados de C4d entre os 4 grupos. Na comparação múltipla, foi verificado que o grupo que possuía maior quantificação de C4d portal foi o grupo de hepatite crônica não-tx comparando-se com o grupo rejeição em VHC ($p=0,003$), com o grupo recidiva VHC ($p<0,001$) e com o grupo rejeição sem VHC ($p=0,019$).

Tabela 6 – Comparação da quantificação de C4d entre os 4 grupos

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p ⁽¹⁾
C4d portal	I - Rejeição em VHC	11,96	16,18	5	0	50	28	0,002
	II - Recidiva VHC	6,00	6,29	5	0	20	25	
	III - Rejeição sem VHC	12,75	14,91	5	0	50	20	
	IV - Hepatite crônica não-tx	21,20	15,02	20	0	70	25	
C4d centrolobular	I - Rejeição em VHC	3,93	13,15	0	0	50	28	0,052
	II - Recidiva VHC	0,00	0,00	0	0	0	25	
	III - Rejeição sem VHC	5,50	14,59	0	0	60	20	
	IV - Hepatite crônica não-tx	0,40	1,38	0	0	5	25	
C4d sinusoidal	I - Rejeição em VHC	0,54	1,57	0	0	5	28	0,206
	II - Recidiva VHC	0,00	0,00	0	0	0	25	
	III - Rejeição sem VHC	0,50	2,24	0	0	10	20	
	IV - Hepatite crônica não-tx	0,80	1,87	0	0	5	25	

⁽¹⁾ Teste de Kruskal-Wallis

A avaliação dos resultados de C4d portal segundo as variáveis categóricas está descrita na tabela 7, e as correlações de Spearman com as variáveis quantitativas e qualitativas ordinais encontram-se na tabela 8.

Tabela 7 – Resultados de C4d portal segundo as variáveis categóricas dos 98 casos

Variável	Média	N	p
Sexo			0,226 ⁽¹⁾
Masculino	11,16	56	
Feminino	15,36	42	
Tipo de tx			0,619 ⁽²⁾
Cadáver	10,00	64	
Intervivos	10,00	2	
Repique	11,67	3	
IFN prévio			0,077 ⁽¹⁾
Não	14,57	35	
Sim	11,71	35	
Genótipo			0,275 ⁽²⁾
1	14,32	44	
2	0,00	1	
3	9,57	23	
RNA VHC prétx			0,394 ⁽¹⁾
Positivo	8,68	38	
Negativo	16,25	4	
MMF/Myfortic			0,889 ⁽¹⁾
Não	10,18	55	
Sim	9,64	14	
Ano bx			0,002 ⁽¹⁾
1998 a 2006	17,45	49	
2007 a 2011	8,47	49	

⁽¹⁾ Teste Mann-Whitney⁽²⁾ Teste Kruskal-Wallis

Tabela 8 - Correlações de Spearman de C4d portal com as características quantitativas e qualitativas ordenadas dos 98 casos

Correlação		C4d portal
Idade	r	-0,142
	p	0,162
Tempo de tx	r	-0,087
	p	0,462
Tempo de isquemia	r	-0,244
	p	0,043
Estadiamento rejeição	r	0,013
	p	0,930
Rejeição inflamação portal	r	-0,204
	p	0,165
Rejeição lesão ductal	r	0,016
	p	0,912
Rejeição lesão endotelial	r	-0,005
	p	0,970
Fibrose portal	r	0,571
	p	<0,001
Inflamação portal	r	0,356
	p	0,011
Inflamação periportal	r	0,336
	p	0,017
Inflamação parenquimatosa confluyente	r	0,274
	p	0,054
Inflamação parenquimatosa focal	r	0,096
	p	0,506

No modelo de regressão linear para análise multivariada para o resultado de C4d portal foram incluídas as variáveis: grupos II (recidiva VHC) e IV (hepatite crônica não-tx), ano de biópsia, graus de fibrose portal, inflamação portal e inflamação periportal. Nesta análise, houve associação independente da quantificação de C4d com o grupo de hepatite crônica não-tx ($p=0,016$), ano de biópsia realizada anteriormente a 2006 ($p=0,032$) e grau de inflamação periportal ($p<0,001$).

4.4 PCR quantitativa de VHC

Os resultados da quantificação de RNA de VHC tecidual de todos os casos estão apresentados no anexo F. Houve resultado positivo em 21,4% (6/28) dos casos do grupo I (rejeição em VHC), em 78,2% (18/23) dos casos do grupo II (recidiva VHC), e em 4% (1/25) dos casos do grupo IV (hepatite crônica não-tx).

A comparação entre os grupos encontra-se na tabela 9. Na análise dois a dois, detectaram-se valores maiores no grupo II (recidiva VHC) comparado ao grupo I (rejeição em VHC) ($p<0,001$). No grupo de hepatite crônica não-tx, houve detecção de RNA em somente 1 caso.

Tabela 9 - Comparação da quantificação de RNA de VHC nos 3 grupos de pacientes com VHC

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p ⁽¹⁾
PCR VHC tecido (IU/ml)	I - Rejeição em VHC	120,50	333,36	25	25	1300	28	<0,001
	II - Recidiva VHC	1610,46	3451,31	231	25	15900	23	
	IV - Hepatite crônica não-tx	26,50	7,48	25	25	62,4	25	

⁽¹⁾ Teste de Kruskal-Wallis

A comparação dos resultados da PCR segundo as variáveis qualitativas encontra-se na tabela 10, e as correlações de Spearman com as variáveis quantitativas e qualitativas ordinais na tabela 11.

Houve correlação estatisticamente significativa da PCR quantitativa de VHC tecidual com a PCR quantitativa de VHC sérica ($r = 0,391$, $p = 0,039$).

Tabela 10 - Quantificação de PCR do VHC segundo as variáveis qualitativas nos 3 grupos de pacientes com VHC

Variável	Média	N	p
Sexo			0,227 ⁽¹⁾
Masculino	457,01	45	
Feminino	661,65	31	
Tipo de tx			0,265 ⁽²⁾
Cadáver	939,14	42	
Intervivos	392,00	2	
Repique	28,83	3	
IFN prévio			0,528 ⁽¹⁾
Não	436,81	34	
Sim	765,45	34	
Genótipo			0,753 ⁽²⁾
1	791,53	43	
2	25,00	1	
3	307,55	22	
RNA VHC prétx			0,913 ⁽¹⁾
Positivo	981,43	36	
Negativo	404,20	4	
MMF/Myfortic			0,673 ⁽¹⁾
Não	524,67	37	
Sim	2090,16	10	
Ano bx			<0,001 ⁽¹⁾
1998 a 2006	75,28	41	
2007 a 2011	1085,44	35	

⁽¹⁾ Teste Mann-Whitney⁽²⁾ Teste Kruskal-Wallis

Tabela 11 - Correlações de Spearman de PCR de VHC com as variáveis quantitativas e qualitativas ordinais dos 3 grupos de pacientes com VHC

Correlação		PCR VHC tecido
Idade	r	0,297
	p	0,009
Tempo de tx	r	0,423
	p	0,002
Isquemia	r	0,013
	p	0,933
Estadiamento rejeição	r	0,106
	p	0,590
Rejeição inflamação portal	r	-0,184
	p	0,349
Rejeição lesão ductal	r	-0,313
	p	0,105
Rejeição lesão endotelial	r	0,094
	p	0,636
Fibrose portal	r	-0,440
	p	0,002
Inflamação portal	r	-0,251
	p	0,086
Inflamação periportal	r	-0,133
	p	0,369
Inflamação parenquimatosa	r	0,045
	p	0,762
Inflamação parenquimatosa focal	r	-0,012
	p	0,938

No modelo de regressão para análise multivariada dos resultados de PCR, foram incluídas as seguintes variáveis: grupos I (rejeição em VHC) e II (recidiva VHC), ano de biópsia, idade e tempo de transplante. Na análise multivariada, fatores independentes para valores maiores de PCR foram o tempo de transplante ($p<0,001$) e o grupo II (recidiva VHC, $p<0,001$).

O desempenho da PCR de VHC para o diagnóstico de recidiva de VHC está demonstrado no Gráfico e nas tabelas 12 e 13. A área abaixo da curva ROC foi de 0,818 (IC95% 0,695-0,942), e o ponto de corte escolhido foi de 58,15 (tabela 13), sendo a sensibilidade para esse ponto de 70% e a especificidade de 89%.

Tabela 12 - Descrição dos pontos de corte de PCR de VHC para o diagnóstico de recidiva de VHC segundo valores de sensibilidade e especificidade

Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	Corretamente classificado	
(≥24,00)	1,00	0,00	0,45	
(≥26,75)	0,78	0,79	0,78	
(≥32,50)	0,74	0,79	0,76	
(≥39,25)	0,70	0,79	0,75	
(≥44,40)	0,70	0,82	0,76	
(≥52,15)	0,70	0,86	0,78	
(≥58,15)	0,70	0,89	0,80	Ponto de corte escolhido
(≥62,75)	0,65	0,89	0,78	
(≥72,15)	0,61	0,89	0,76	
(≥91,80)	0,61	0,93	0,78	
(≥155,50)	0,57	0,93	0,76	
(≥218,00)	0,52	0,93	0,75	
(≥238,00)	0,48	0,93	0,73	
(≥392,00)	0,44	0,93	0,71	
(≥555,50)	0,39	0,93	0,69	
(≥654,50)	0,35	0,93	0,67	
(≥1018,50)	0,30	0,93	0,65	
(≥1410,00)	0,30	1,00	0,69	
(≥1540,00)	0,26	1,00	0,67	
(≥1750,00)	0,22	1,00	0,65	
(≥2715,00)	0,17	1,00	0,63	
(≥4120,00)	0,13	1,00	0,61	
(≥4840,00)	0,09	1,00	0,59	
(≥10415,00)	0,04	1,00	0,57	
(≥15901,00)	0,00	1,00	0,55

Gráfico - Curva ROC da PCR do VHC em tecido para definição do ponto de corte que discrimina paciente com recidiva de VHC de rejeição aguda pós-transplante de fígado por VHC

Tabela 13 – Acurácia diagnóstica da PCR de VHC para prever recidiva de VHC em 51 casos com ponto de corte $\geq 58,15$ UI/ml

Característica do teste	Desempenho	IC95%
Acurácia	0,80	
Sensibilidade	0,70	0,47 - 0,87
Especificidade	0,89	0,72 - 0,98
VPP	0,84	0,60 - 0,97
VPN	0,78	0,60 - 0,91
Razão de verossimilhanças positiva	6,49	2,16 - 19,6
Razão de verossimilhanças negativa	0,34	0,18 - 0,64

VPP = valor preditivo positivo, VPN = valor preditivo negativo

5 Discussão

O diagnóstico diferencial entre rejeição aguda e recidiva de VHC é de fundamental importância na definição da conduta terapêutica. Em casos de rejeição, devem ser administradas drogas imunossupressoras, como corticosteróides em altas doses, o que poderia acelerar a progressão da recidiva de VHC. Em casos de recidiva do VHC, deve ser iniciada terapia antiviral de acordo com o grau de recidiva ³. O presente estudo teve como principal objetivo estudar os marcadores teciduais C4d e PCR de VHC para auxiliar no diagnóstico histológico dessas duas entidades. Os resultados mostram que não houve diferença estatística na quantificação de C4d entre os grupos de rejeição em paciente transplantado por VHC e recidiva de VHC. Em contrapartida, a PCR de VHC demonstrou bom desempenho.

Estudos publicados anteriormente, como o de Schmeding et al. ⁹, sugeriram que o C4d poderia ter um papel importante nesse diagnóstico diferencial, porém havia somente 9 pacientes transplantados por VHC naquele estudo. O mesmo grupo não evidenciou diferença no C4d em um estudo com número maior de pacientes com VHC, porém a técnica utilizada foi a de Elisa. Outros estudos evidenciaram a importância do C4d no diagnóstico diferencial, porém também com pequeno número de casos ^{7,8}.

No presente trabalho, a deposição de C4d foi semelhante nos grupos de rejeição e recidiva viral. As diferenças encontradas quanto às características demográficas, clínicas e laboratoriais entre os grupos não são fatores que a princípio pudessem ter influenciado nos resultados. Tanto a

idade dos indivíduos como a idade do doador entre os grupos principais foi semelhante. O tempo de transplante foi significativamente maior no grupo de recidiva viral, o que era esperado desde o planejamento do estudo. Como o diagnóstico histológico foi considerado o padrão-ouro, havia necessidade de diagnósticos de rejeição aguda e recidiva viral de certeza, o que é mais facilmente encontrado nesses extremos de tempo pós-transplante.

Um achado do estudo foi intensa deposição de C4d no grupo de hepatite C crônica não-transplantado, comparando-se com os demais grupos. Um estudo retrospectivo de 52 pacientes pediátricos avaliou a deposição de C4d em doenças hepáticas inflamatórias em não-transplantados ⁶⁶. Os autores demonstraram positividade do marcador em 6 de 15 biópsias (40%) de casos de hepatite C crônica, 17/19 (89%) biópsias de casos de hepatite B crônica, e em 25/30 (83%) biópsias de casos de hepatite auto-imune, e sugerem que o C4d não seja um bom marcador para o diagnóstico diferencial com rejeição, dado o alto índice de positividade em hepatites virais. Além desse estudo, outros autores encontraram positividade de C4d em doenças como hepatite B crônica, hepatite autoimune e esteatohepatite, o que nos leva a questionar a especificidade do C4d como marcador de rejeição humoral ^{34, 44, 67}.

Tanto o sistema imune inato quanto o adquirido possuem um papel importante na modulação de fibrose hepática ⁶⁸, e o sistema complemento está envolvido na patogênese da hepatite crônica pelo VHC ²⁷. Um trabalho estudou o mecanismo de ativação do sistema complemento *in vitro* induzida pelo frio em amostras de soro de pacientes com e sem hepatite C ⁶⁹, um

fenômeno associado a doenças hepáticas crônicas, principalmente em manifestações extrahepáticas de VHC. Este trabalho demonstrou maiores níveis de C4d em amostras de pacientes com VHC e, portanto, sugere a ativação das vias clássica e das lectinas na patogênese da doença.

O envolvimento do sistema complemento foi também estudado em outros trabalhos, porém não diretamente com C4d. Na fase terminal da cascata de ativação do complemento, ocorre a polimerização de C9 ao complexo C5b-8, formando o complexo de ataque a membrana (MAC), que é o produto final da via. O MAC produz a destruição da integridade da membrana lipídica celular, e um estudo que realizou a detecção de MAC por imunohistoquímica demonstrou que o complexo está presente em hepatócitos que circundam áreas necróticas em pacientes com hepatite aguda e fulminante ⁷⁰. A ativação da via das lectinas através da interação com glicoproteínas E1 e E2 do VHC também já foi demonstrada como mecanismo de resposta imune ao VHC ⁷¹. Além disso, um estudo experimental com ratos demonstrou a importância do C5 e C5aR (receptor de C5), que é um produto da fase final de ativação do sistema complemento, na fibrogênese ⁷². Nesse mesmo estudo foi demonstrado, através de imunohistoquímica, detecção de C5aR1 em altos níveis em células de Ito, que são as principais células responsáveis pela fibrogênese hepática, com aumento significativo durante a diferenciação em miofibroblastos. Em contrapartida, um estudo *in vitro* demonstrou que há menor expressão de mRNA de C4 na presença de proteínas do core e NS5A do VHC, comparando-se com amostras de tecido hepático sem VHC ⁷³. Outro estudo

⁷⁴ também observou menores níveis de C4 em indivíduos com hepatite crônica comparados com indivíduos saudáveis. Ambos os estudos tinham como controles indivíduos sem VHC, porém sem avaliação de correlação entre C4 e graus de fibrose.

Visto que o compartimento portal foi o que apresentou maior deposição de C4d, procedeu-se análise univariada para verificar as variáveis associadas aos resultados deste compartimento. Houve associação com o grau de fibrose portal e inflamação portal e periportal, porém visto que no grupo IV (hepatite crônica) havia significativamente mais casos com maiores graus desses parâmetros, considerou-se possível serem fatores de confusão. Na análise multivariada, tanto o grupo IV quanto a inflamação periportal foram fatores independentes de associação e, portanto, a associação com graus de fibrose e inflamação portal não deve estar presente. Este aspecto constitui uma das limitações do estudo, uma vez que os graus de fibrose e inflamação portal e periportal não eram semelhantes entre os grupos de hepatite crônica transplantados e não-transplantados.

Quanto à técnica utilizada para detecção de C4d, não há estudos em transplante de fígado com comparação das diferentes técnicas. Em transplante de rim, há um trabalho que demonstra melhor desempenho com anticorpo monoclonal e detecção por imunofluorescência em tecido congelado comparado ao uso de anticorpo policlonal e detecção por imunohistoquímica em tecido parafinado, com perda de positividade de difuso para focal e de focal para mínimo ou ausente em 30% dos casos ⁷⁵. Neste estudo, houve excelente concordância inter e intraobservador na

gradação de C4d em material congelado (kappa 0,9) e boa concordância inter (kappa 0,57) e intraobservador (kappa 0,68) em tecido parafinado.

Para verificar a influência de maior tempo de armazenamento dos blocos de parafina nos resultados de imunohistoquímica para detecção de C4d, foi analisado o ano em que a biópsia foi realizada. Porém detectamos valores maiores de quantificação em biópsias anteriores a 2006, afastando a possibilidade de tal influência.

Encontra-se grande heterogeneidade entre os trabalhos publicados quanto à forma de gradação e ao local de deposição de C4d, visto que não existem ainda recomendações de consenso para este marcador no transplante de fígado. Na tabela 14 encontram-se resumidos os estudos e suas respectivas formas de gradação e descrição de deposição. De uma maneira geral, é sugerido que somente a forma difusa, comumente denominada para marcações em mais que 50% dos compartimentos, seja considerada positiva. Na maioria dos estudos, a gradação foi realizada de modo semiquantitativo. No presente trabalho, foi optada pela quantificação estimada de cada compartimento para maior precisão do resultado.

Tabela 14 - Descrição do local de deposição e forma de graduação dos principais trabalhos com C4d em transplante de fígado ^{7-9, 31-36, 44-46}

Trabalho	Local de deposição	Graduação
Krukemeyer, 2004	Capilares portais e sinusóides	focal ou difusa
Dankof, 2005	Células endoteliais de vasos portais	positiva (difusa e focal) negativa (fraca ou ausente)
Bu, 2006	Vasos portais e sinusóides hepáticos	Positiva/negativa
Sawada, 2006	Vasos portais e sinusóides hepáticos	Positiva/negativa
Sakashita, 2006	Vasos portais, estroma portal, sinusóides, região perivenular, lóbulo hepático	>50% tratos portais = difuso <50% tratos portais = focal Tecido conectivo fora do parênquima ou fibras elásticas = negativo
Schmeding, 2006	Células endoteliais de vasos portais	Positivo/negativo
Jain, 2006	Lóbulos hepáticos - hepatócitos (moderada a forte)	ausente (grau 0) mínima (grau 1) moderada (grau 2); forte (grau 3)
Lorho, 2006	Sinusóides hepáticos	negativo positivo em menos de 50% sinusóides positivo em mais de 50% sinusóides
Kozlowski, 2011	Vasos portais e periportais, sinusóides hepáticos	difuso (>50% compartimento) focal (<50% compartimento) padrão linear ou granular intensidade: negativo (0), fraco (1), moderado (2) e forte (3)
Aguilera, 2011	Vasos portais e sinusóides hepáticos Fibras nervosas periféricas	Positivo/negativo
Musat, 2011	Vasos e estroma portais, sinusóides hepáticos	difuso (>50% compartimento) focal (<50% compartimento)
Lunz, 2011	Vasos e estroma portais, sinusóides e veia centrolobular	2 maneiras: mínima (<10% da amostra) focal (10-50% da amostra) difusa (>50% da amostra) mínimo/negativo: positivo em espaço porta ocasionalmente focal: em pelo menos 2 dos 3 locais (veia porta, artéria hepática e capilares portais) na minoria das tríades difuso: idem ao anterior porém na maioria das tríades

O fato deste trabalho não ter encontrado diferença na deposição de C4d entre amostras com rejeição aguda e recidiva viral confirma que mecanismos humorais estão presentes em uma pequena parcela dos episódios de rejeição aguda. Entretanto, os mecanismos humorais também estão presentes na infecção pelo VHC, dificultando a utilização deste marcador no diagnóstico diferencial das duas situações. O diagnóstico de rejeição humoral em transplante de fígado tem sido alvo de muitas publicações recentes, principalmente no que se refere à positividade de C4d e sua correlação com “crossmatch” positivo através da presença de anticorpos específicos do doador (DSA). O fato de não haver a correlação com anticorpos específicos contra antígenos do doador constitui uma limitação deste estudo. Tendo em vista as últimas publicações no assunto ^{36, 44-46, 76}, nota-se que o papel do C4d ainda não foi completamente elucidado em transplante de fígado. Dados existentes apontam para a necessidade de estudos prospectivos com realização de “crossmatch” pré-transplante e, no momento de cada episódio de rejeição, realização de C4d nas amostras com descrição do local de deposição, conjuntamente com descrição de alterações morfológicas em caso de rejeição.

A quantificação de RNA de VHC foi significativamente maior nos casos de recidiva viral em relação aos de rejeição em pacientes transplantados por VHC, com boa acurácia para o diagnóstico de recidiva viral. Esse resultado corrobora os de estudos anteriores ^{11, 12, 14}, apesar da utilização de técnicas diferentes. De acordo com os dados da curva ROC, na

presença de alterações morfológicas, a especificidade da PCR para o diagnóstico de recidiva é de 100% para valores acima de 1410 UI/ml.

Visto que o tempo de transplante foi diferente entre os dois grupos principais, existe a necessidade de reprodução desses resultados frente a amostras pareadas quanto a essa variável, para validação do teste como diferenciador dos dois diagnósticos. Além disso, deve-se considerar a complexidade técnica de sua realização para se definir sua utilização na prática clínica. .

No grupo de rejeição em VHC, o encontro de positividade de RNA de VHC em 6 casos pode significar a presença de reinfecção tecidual, que precede a presença de alterações histológicas, como sugerido por Guerrero et al.⁴⁹.

Foi encontrada correlação entre PCR quantitativa sérica e tecidual, corroborando estudos anteriores tanto em casos de hepatite crônica não-transplantados como em transplantados^{51, 56, 77}.

No grupo IV (hepatite crônica não-tx), a PCR de VHC foi menor do que o limite inferior de detecção do teste em todas as amostras exceto uma. Uma possível explicação para esse resultado é o fato de as biópsias desse grupo terem sido realizadas em sua maioria havia mais de cinco anos. Um estudo examinou os efeitos de armazenamento prolongado de tecido em formol e na forma de bloco sobre o resultado de PCR de VHC em 20 biópsias hepáticas⁷⁸. Foi demonstrado que houve diminuição da sensibilidade da detecção de RNA comparando-se o tempo de fixação em formol (100% com 24 horas, 85% com 3-4 dias, e 0% com anos de fixação),

porém sem influência do tempo de armazenamento em bloco de parafina. No Hospital das Clínicas da FMUSP, o tempo de fixação em formol varia de 8 a 24 horas, porém as amostras de pacientes transplantados são processadas na urgência e, portanto, o tempo máximo de fixação em formol dessas biópsias é de 2 horas. Isso pode ter influenciado no resultado do grupo de hepatite crônica não-transplantado, pois nesse grupo nenhuma amostra foi processada na urgência.

Outro aspecto relevante que deve ser considerado quanto à técnica da PCR em tecido é a variabilidade da qualidade de RNA extraído quando o material utilizado é tecido parafinado. O estudo experimental de Chung et al.⁷⁹ sugere que os efeitos da fixação em formol, tempo de processamento para parafinização e tempo de armazenamento em parafina possam influenciar na recuperação de RNA.

A PCR quantitativa do VHC mostrou-se ser um potencial teste para o diagnóstico diferencial entre rejeição e recidiva viral, porém ainda são necessários estudos para a validação de sua utilidade.

6 Conclusões

1. Deposição tecidual hepática de C4d esteve presente em todos os grupos, principalmente no compartimento portal, sem diferença na quantificação entre os grupos principais. Não houve, portanto, evidência de papel no diagnóstico diferencial entre rejeição e recidiva da hepatite C pós-transplante de fígado.
2. A quantificação de C4d portal foi significativamente maior no grupo de hepatite crônica não-transplantado.
3. A quantificação de C4d portal correlacionou-se com o grau de inflamação periportal na hepatite crônica.
4. A quantificação de RNA de VHC por PCR em tecido hepático foi significativamente maior no grupo de recidiva de VHC comparado ao grupo de rejeição em paciente com VHC. Apresentou, desta forma, evidência de potencial uso no diagnóstico diferencial entre rejeição e recidiva da hepatite C pós-transplante de fígado.
5. A quantificação tecidual de RNA do VHC correlacionou-se com o tempo de transplante e com a PCR quantitativa sérica.

7 Anexos

Anexo A – Classificação de Ishak modificado para o diagnóstico de hepatite crônica

Fibrose portal:

- 0 (ausente)
- 1 (Expansão fibrosa em algumas áreas portais, com ou sem septos fibrosos curtos)
- 2 (Expansão fibrosa na maioria das áreas portais, com ou sem septos fibrosos curtos)
- 3 (Expansão fibrosa na maioria das áreas portais, com ocasionais pontes porta-porta)
- 4 (Expansão fibrosa de áreas portais, com marcada fibrose em ponte – porta-porta e/ou porta-centro)
- 5 (marcada fibrose em ponte - porta-porta e/ou porta-centro - com nódulos ocasionais).
“Cirrose incompleta”
- 6 (Cirrose, provável ou definida)

Inflamação portal:

- 0 (ausente)
- 1 (leve, alguns ou todos os espaços portais)
- 2 (moderada, alguns ou todos os espaços portais)
- 3 (moderada/acentuada, todos os espaços portais)
- 4 (acentuada , todos os espaços portais)

Atividade periportal:

- 0 (ausente)
- 1 (leve, focal e em poucas áreas portais)
- 2 (leve/moderada, focal e na maioria das áreas portais)
- 3 (moderada, contínua e ao redor de <50% dos tratos ou septos)
- 4 (acentuada, contínua e ao redor de >50% dos tratos ou septos)

Atividade parenquimatosa:

Necrose confluyente

- 0 (Ausente)
- 1 (necrose confluyente focal)
- 2 (necrose de zona 3 em algumas áreas)
- 3 (necrose de zona 3 na maioria das áreas)
- 4 (necrose de zona 3 + ocasional ponte porta-centro)
- 5 (necrose de zona 3 + múltiplas pontes porta-centro)
- 6 (Necrose multi-acinar ou pan-acinar)

Necrose lítica focal, apoptose e inflamação focal

- 1 (Um foco ou menos por campo em objetiva de 10x)
- 2 (Dois a quatro focos por campo em objetiva de 10x)
- 3 (Cinco a dez focos por campo em objetiva de 10x)
- 4 (Mais de dez focos por campo em objetiva de 10x)

Anexo B – Índice de atividade de rejeição segundo os critérios de Banff

Categoria	Critério	Pontuação
Inflamação portal	Inflamação predominantemente linfocítico envolvendo, mas não claramente expandindo, a minoria das tríades	1
	Expansão da maioria ou de todas as tríades, por um infiltrado misto contendo linfócitos com ocasionais blastos, neutrófilos e ocasionais eosinófilos	2
	Marcada expansão da maioria ou de todas as tríades por um infiltrado misto contendo numerosos blastos e eosinófilos com "spillover" do infiltrado no parênquima periportal	3
Inflamação e lesão de ducto biliar	A minoria dos ductos está agredida e infiltrada por células inflamatórias e apresentam apenas leves alterações reativas como aumento da relação núcleo-citoplasmática das células epiteliais	1
	A maioria ou todos os ductos infiltrados por células inflamatórias; mais de um ducto ocasional apresenta alterações degenerativas como pleomorfismo nuclear, alteração na polaridade e vacuolização citoplasmática do epitélio	2
	Similar ao grau 2, com a maioria ou todos os ductos apresentando alterações degenerativas ou rompimento da lâmina basal focal	3
Inflamação de endotélio venoso	Infiltração linfocítica subendotelial envolvendo alguns, mas não a maioria das vênulas portais ou hepáticas	1
	Infiltração subendotelial envolvendo a maioria ou todas as vênulas portais ou hepáticas	2
	Similar ao grau 2, com moderada a grave inflamação perivenular e está associada a necrose hepatocitária perivenular	3

Anexo C – Estadiamento de rejeição aguda de acordo com a avaliação global

Avaliação global	Critérios
Leve	Infiltrado de rejeição na minoria das tríades, que é geralmente leve, e confinado aos espaços-porta
Moderada	Infiltrado de rejeição, com expansão da maioria ou de todas as tríades
Grave	Similar ao moderado, com derramamento em áreas periportais e de moderada a grave inflamação perivenular que se estende ao parênquima hepático e está associada a necrose hepatocítica perivenular

Anexo D – Tabela para cálculo do tamanho amostral para cada grupo considerando-se a proporção de positividade de C4d em recidiva do VHC e rejeição aguda.

Proporção de positividade de C4d		Tamanho amostral para cada grupo*
Recidiva HCV	Rejeição Aguda	
0.05	0.75	9
0.05	0.7	11
0.05	0.65	12
0.05	0.6	14
0.05	0.55	16
0.1	0.75	11
0.1	0.7	13
0.1	0.65	15
0.1	0.6	17
0.1	0.55	20
0.15	0.75	13
0.15	0.7	15
0.15	0.65	18
0.15	0.6	22
0.15	0.55	26
0.2	0.75	16
0.2	0.7	19
0.2	0.65	22
0.2	0.6	28
0.2	0.55	35

*Teste de duas amostras para comparação de proporções, com nível de significância de 0.05 e poder de 0.8.

Anexo E - Características do teste diagnóstico avaliado calculadas pela comparação com teste padrão-ouro ⁶⁵

Característica do teste	Sinônimo	Questão abordada	Fórmula
Sensibilidade	Taxa de verdadeiros-positivos	Qual é o desempenho desse teste em corretamente identificar indivíduos com a doença?	$a/a+c$
Especificidade	Taxa de verdadeiros-negativos	Qual é o desempenho desse teste em corretamente excluir indivíduos sem a doença?	$d/b+d$
Valor preditivo positivo	Probabilidade pós-teste de um teste positivo	Qual a probabilidade de um teste positivo diagnosticar a doença?	$a/a+b$
Valor preditivo negativo	Probabilidade pós-teste de um teste negativo	Qual a probabilidade de um teste negativo excluir a doença?	$d/c+d$
Acurácia	Verdadeiros-positivos e negativos como proporção de todos os resultados	Qual a proporção de todos os testes tem obtido o resultado correto?	$a+d/a+b+c+d$
Razão de verossimilhança de um teste positivo	—	Quantas vezes é mais provável o teste ser positivo em um indivíduo com a doença do que em um indivíduo sadio?	$\text{Sensibilidade}/1-\text{Especificidade}$
Razão de verossimilhança de um teste negativo	—	Quantas vezes é mais provável o teste ser negativo em um indivíduo sem a doença do que em um indivíduo doente?	$1-\text{Sensibilidade}/\text{Especificidade}$

Segundo tabela de contingência "dois por dois" para cálculo das características do teste diagnóstico em comparação com teste padrão-ouro, em que a=verdadeiros positivos, d=verdadeiros negativos, b=falsos positivos e c=falsos negativos.

Anexo F - Resultados de C4d e PCR de VHC dos 98 casos

Grupo	C4d portal	C4d sinusoidal	C4d centrolobular	PCR VHC	Grupo	C4d portal	C4d sinusoidal	C4d centrolobular	PCR VHC
1	0	0	0	25	3	0	0	0	
1	5	0	0	25	3	30	0	0	
1	20	0	0	1300	3	10	0	0	
1	40	0	0	25	3	0	0	0	
1	0	0	0	25	3	0	0	0	
1	0	0	0	46,8	3	20	0	0	
1	0	0	10	25	3	30	0	5	
1	0	0	0	25	3	0	0	0	
1	0	0	0	25	3	0	0	0	
1	0	0	0	25	3	50	0	10	
1	0	0	0	25	3	0	0	0	
1	0	0	0	1300	3	20	0	60	
1	0	0	0	77,6	3	0	0	0	
1	10	5	0	25	3	5	0	0	
1	20	0	0	25	3	30	0	5	
1	50	5	50	25	3	20	0	30	
1	30	5	50	25	3	30	10	0	
1	5	0	0	25	3	5	0	0	
1	40	0	0	25	3	0	0	0	
1	0	0	0	25	3	5	0	0	
1	10	0	0	25	4	10	5	5	25
1	0	0	0	42	4	5	0	0	25
1	20	0	0	25	4	20	0	0	25
1	0	0	0	25	4	5	0	0	25
1	10	0	0	25	4	30	5	0	62,4
1	50	0	0	25	4	40	0	0	25
1	5	0	0	57,5	4	30	0	0	25
1	20	0	0	25	4	70	0	0	25
2	5	0	0	4930	4	20	0	0	25
2	10	0	0	572	4	30	5	0	25
2	10	0	0	3490	4	10	0	0	25
2	5	0	0	25	4	30	0	5	25
2	5	0	0	1520	4	30	0	0	25
2	0	0	0	58,8	4	10	0	0	25
2	0	0	0	539	4	20	0	0	25
2	5	0	0	25	4	30	0	0	25
2	20	0	0	66,7	4	20	5	0	25
2	5	0	0	25	4	10	0	0	25
2	5	0	0	737	4	30	0	0	25
2	0	0	0	25	4	0	0	0	25
2	0	0	0	25	4	0	0	0	25
2	20	0	0	231	4	30	0	0	25
2	5	0	0		4	20	0	0	25
2	5	0	0	28,5	4	10	0	0	25
2	5	0	0	106	4	20	0	0	25
2	10	0	0	36,5					
2	20	0	0	245					
2	0	0	0	205					
2	10	0	0	4750					
2	0	0	0						
2	0	0	0	1560					
2	0	0	0	15900					
2	5	0	0	1940					

Anexo G - Aprovação da CapPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 22/10/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0829/08**, intitulado: "**MARCADORES TECIDUAIS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE REJEIÇÃO E RECIDIVA DE HEPATITE C EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE FÍGADO**" apresentado pelo Departamento de MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Edson Abdala**

Pesquisador (a) Executante: **Alice Tung Wan Song**

CAPPesq, 23 de Outubro de 2008

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8 Referências

1. Abdala E, Gotardo, DRM, Bonazzi, PR, Bacchella, T Hepatitis C Treatment Before and After Liver Transplant. *Braz J Infect Dis.* 2007;11:61-5.
2. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl.* 2002;8:S14-8.
3. Burton JR, Jr., Rosen HR. Acute rejection in HCV-infected liver transplant recipients: The great conundrum. *Liver Transpl.* 2006;12:S38-47.
4. Regev A, Molina E, Moura R, Bejarano PA, Khaled A, Ruiz P, et al. Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004;10:1233-9.
5. Leung JY, Abraczinskas DR, Bhan AK, Terella AM, Pascual M, Cosimi AB, et al. Recurrent allograft HCV presenting as acute cellular rejection: successful management with interferon and ribavirin alone. *Clin Transplant.* 2003;17:275-83.
6. McCaughan GW, Zekry A. Pathogenesis of hepatitis C virus recurrence in the liver allograft. *Liver Transpl.* 2002;8:S7-S13.
7. Jain A, Ryan C, Mohanka R, Orloff M, Abt P, Romano J, et al. Characterization of CD4, CD8, CD56 positive lymphocytes and C4d deposits to distinguish acute cellular rejection from recurrent hepatitis C in post-liver transplant biopsies. *Clin Transplant.* 2006;20:624-33.
8. Lorho R, Turlin B, Aqodad N, Triki N, de Lajarte-Thirouard AS, Camus C, et al. C4d: a marker for hepatic transplant rejection. *Transplant Proc.* 2006;38:2333-4.

9. Schmeding M, Dankof A, Krenn V, Krukemeyer MG, Koch M, Spinelli A, et al. C4d in acute rejection after liver transplantation--a valuable tool in differential diagnosis to hepatitis C recurrence. *Am J Transplant.* 2006;6:523-30.
10. Schmeding M, Kienlein S, Rocken C, Neuhaus R, Neuhaus P, Heidenhain C, et al. ELISA-based detection of C4d after liver transplantation--a helpful tool for differential diagnosis between acute rejection and HCV-recurrence? *Transpl Immunol.* 2010;23:156-60.
11. Aardema KL, Nakhleh RE, Terry LK, Burd EM, Ma CK, Moonka DK, et al. Tissue quantification of hepatitis C virus RNA with morphologic correlation in the diagnosis of recurrent hepatitis C virus in human liver transplants. *Mod Pathol.* 1999;12:1043-9.
12. D'Errico-Grigioni A, Fiorentino M, Vasuri F, Gruppioni E, Fabbrizio B, Zucchini N, et al. Tissue hepatitis C virus RNA quantification and protein expression help identify early hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008;14:313-20.
13. Fragulidis GP, Cirocco RE, Weppler D, Berho M, Gillian G, Markou M, et al. In situ enzymatic oligonucleotide amplification of hepatitis C virus-RNA in liver biopsy specimens (reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction) after orthotopic liver transplantation for hepatitis C-related liver disease. *Transplantation.* 1998;66:1472-6.
14. Gottschlich MJ, Aardema KL, Burd EM, Nakhleh RE, Brown KA, Abouljoud MS, et al. The use of hepatitis C viral RNA levels in liver tissue to distinguish rejection from recurrent hepatitis C. *Liver Transpl.* 2001;7:436-41.
15. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat.* 1999;6:35-47.

16. SBH. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. *GED*. 1999;53-8.
17. Saab S, Wang V. Recurrent hepatitis C following liver transplant: diagnosis, natural history, and therapeutic options. *J Clin Gastroenterol*. 2003;37:155-63.
18. Berenguer M. Management of hepatitis C virus in the transplant patient. *Clin Liver Dis*. 2007;11:355-76.
19. Gane EJ. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl*. 2008;14 Suppl 2:S36-44.
20. Samuel D, Forns X, Berenguer M, Trautwein C, Burroughs A, Rizzetto M, et al. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis (Paris, France, January 12-14, 2006). *J Hepatol*. 2006;45:127-43.
21. Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A, Ruppert K, Nalesnik MA, Randhawa P, et al. Recurrent hepatitis C in liver allografts: prospective assessment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:658-69.
22. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol*. 2003;25:119-40.
23. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology*. 1997;25:658-63.
24. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of Rejection: Current Perspectives. *Transplantation*. 2012;93:1-10.

-
25. Singh N, Pirsch J, Samaniego M. Antibody-mediated rejection: treatment alternatives and outcomes. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009;23:34-46.
 26. Rotman S, Bernard Collins, A, Colvin, RB. C4d deposition in allografts: current concepts and interpretation. *Transplantation Reviews*. 2005:65-77.
 27. Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol*. 2006;3:333-40.
 28. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010;20:34-50.
 29. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1046-56.
 30. Takakura K, Kiuchi T, Kasahara M, Inomata Y, Tanaka K. Humoral immunity in acute cellular rejection after living-donor liver transplantation. *Transplant Proc*. 1999;31:526-7.
 31. Sawada T, Shimizu A, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S. Lobular damage caused by cellular and humoral immunity in liver allograft rejection. *Clin Transplant*. 2005;19:110-4.
 32. Dankof A, Schmeding M, Morawietz L, Gunther R, Krukemeyer MG, Rudolph B, et al. Portal capillary C4d deposits and increased infiltration by macrophages indicate humorally mediated mechanisms in acute cellular liver allograft rejection. *Virchows Arch*. 2005;447:87-93.
 33. Krukemeyer MG, Moeller J, Morawietz L, Rudolph B, Neumann U, Theruvath T, et al. Description of B lymphocytes and plasma cells, complement, and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 2004;78:65-70.

-
34. Bu X, Zheng Z, Yu Y, Zeng L, Jiang Y. Significance of C4d deposition in the diagnosis of rejection after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2006;38:1418-21.
35. Sakashita H, Haga H, Ashihara E, Wen MC, Tsuji H, Miyagawa-Hayashino A, et al. Significance of C4d staining in ABO-identical/compatible liver transplantation. *Mod Pathol.* 2007;20:676-84.
36. Lunz J, Ruppert KM, Cajaiba MM, Isse K, Bentejewski CA, Minervini M, et al. Re-examination of the Lymphocytotoxic Crossmatch in Liver Transplantation: Can C4d Stains Help in Monitoring? *Am J Transplant.* 2011.
37. Kasahara M, Kiuchi T, Takakura K, Uryuhara K, Egawa H, Asonuma K, et al. Postoperative flow cytometry crossmatch in living donor liver transplantation: clinical significance of humoral immunity in acute rejection. *Transplantation.* 1999;67:568-75.
38. Iwatsuki S, Iwaki Y, Kano T, Klintmalm G, Koep LJ, Weil R, et al. Successful liver transplantation from crossmatch-positive donors. *Transplant Proc.* 1981;13:286-8.
39. Donaldson PT, Thomson LJ, Heads A, Underhill JA, Vaughan RW, Rolando N, et al. IgG donor-specific crossmatches are not associated with graft rejection or poor graft survival after liver transplantation. An assessment by cytotoxicity and flow cytometry. *Transplantation.* 1995;60:1016-23.
40. Muro M, Marin L, Miras M, Moya-Quiles R, Minguela A, Sanchez-Bueno F, et al. Liver recipients harbouring anti-donor preformed lymphocytotoxic antibodies exhibit a poor allograft survival at the first year after transplantation: experience of one centre. *Transpl Immunol.* 2005;14:91-7.

-
41. Suehiro T, Shimada M, Kishikawa K, Shimura T, Soejima Y, Yoshizumi T, et al. Influence of HLA compatibility and lymphocyte cross-matching on acute cellular rejection following living donor adult liver transplantation. *Liver Int.* 2005;25:1182-8.
42. Castillo-Rama M, Castro MJ, Bernardo I, Meneu-Diaz JC, Elola-Olaso AM, Calleja-Antolin SM, et al. Preformed antibodies detected by cytotoxic assay or multibead array decrease liver allograft survival: role of human leukocyte antigen compatibility. *Liver Transpl.* 2008;14:554-62.
43. Bellamy CO, Herriot MM, Harrison DJ, Bathgate AJ. C4d immunopositivity is uncommon in ABO-compatible liver allografts, but correlates partially with lymphocytotoxic antibody status. *Histopathology.* 2007;50:739-49.
44. Aguilera I, Sousa JM, Gavilan F, Gomez L, Alvarez-Marquez A, Nunez-Roldan A. Complement component 4d immunostaining in liver allografts of patients with de novo immune hepatitis. *Liver Transpl.* 2011;17:779-88.
45. Kozlowski T, Rubinas T, Nickeleit V, Woosley J, Schmitz J, Collins D, et al. Liver allograft antibody-mediated rejection with demonstration of sinusoidal C4d staining and circulating donor-specific antibodies. *Liver Transpl.* 2011;17:357-68.
46. Musat AI, Agni RM, Wai PY, Pirsch JD, Lorentzen DF, Powell A, et al. The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11:500-10.
47. Ballardini G, Manzin A, Giostra F, Francesconi R, Groff P, Grassi A, et al. Quantitative liver parameters of HCV infection: relation to HCV genotypes, viremia and response to interferon treatment. *J Hepatol.* 1997;26:779-86.

-
48. Gervais A, Martinot M, Boyer N, Auperin A, Le Breton W, Degott C, et al. Quantitation of hepatic hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. Relationship with severity of disease, viral genotype and response to treatment. *J Hepatol*. 2001;35:399-405.
49. Guerrero RB, Batts KP, Burgart LJ, Barrett SL, Germer JJ, Poterucha JJ, et al. Early detection of hepatitis C allograft reinfection after orthotopic liver transplantation: a molecular and histologic study. *Mod Pathol*. 2000;13:229-37.
50. Hasui T, Shimomura H, Tsuji H, Wato M, Tsuji T. Quantitation of hepatitis C virus RNA in liver tissue as a predictive marker of the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Acta Med Okayama*. 1994;48:151-7.
51. Martin J, Navas S, Quiroga JA, Colucci G, Pardo M, Carreno V. Quantitation of hepatitis C virus in liver and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 1998;54:265-70.
52. Negro F, Giostra E, Krawczynski K, Quadri R, Rubbia-Brandt L, Mentha G, et al. Detection of intrahepatic hepatitis C virus replication by strand-specific semi-quantitative RT-PCR: preliminary application to the liver transplantation model. *J Hepatol*. 1998;29:1-11.
53. Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, Kinoshita M, Ninomiya T, Ohta K, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1995;48:820-5.
54. Terrault NA, Dailey PJ, Ferrell L, Collins ML, Wilber JC, Urdea MS, et al. Hepatitis C virus: quantitation and distribution in liver. *J Med Virol*. 1997;51:217-24.

-
55. Svoboda-Newman SM, Greenson JK, Singleton TP, Sun R, Frank TS. Detection of hepatitis C by RT-PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue from liver transplant patients. *Diagn Mol Pathol*. 1997;6:123-9.
56. Nuovo GJ, Holly A, Wakely P, Jr., Frankel W. Correlation of histology, viral load, and in situ viral detection in hepatic biopsies from patients with liver transplants secondary to hepatitis C infection. *Hum Pathol*. 2002;33:277-84.
57. Grassi A, Quarneti C, Ravaioli M, Bianchini F, Susca M, D'Errico A, et al. Detection of HCV antigens in liver graft: relevance to the management of recurrent post-liver transplant hepatitis C. *Liver Transpl*. 2006;12:1673-81.
58. Ciccorossi P, Filipponi F, Oliveri F, Campani D, Colombatto P, Bonino F, et al. Increasing serum levels of IgM anti-HCV are diagnostic of recurrent hepatitis C in liver transplant patients with ALT flares. *J Viral Hepat*. 2003;10:168-73.
59. Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl*. 2003;9:S1-9.
60. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995;22:696-9.
61. Neter J KM, Nachtsheim TJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistic Models*. 4a ed. Illinois: McGraw-Hill/Irwin; 1996.
62. Kirkwood B, Sterne J. *Essential Medical Statistics*. 2a ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

-
63. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized Linear Models*. 2a ed. New York: Chapman and Hall; 1989.
64. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143:29-36.
65. Greenhalgh T. How to read a paper. Papers that report diagnostic or screening tests. *BMJ*. 1997;315:540-3.
66. Bouron-Dal Soglio D, Rougemont AL, Herzog D, Soucy G, Alvarez F, Fournet JC. An immunohistochemical evaluation of C4d deposition in pediatric inflammatory liver diseases. *Hum Pathol*. 2008;39:1103-10.
67. Rensen SS, Slaats Y, Driessen A, Peutz-Kootstra CJ, Nijhuis J, Steffensen R, et al. Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;50:1809-17.
68. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:425-56.
69. Ishii Y, Shimomura H, Itoh M, Miyake M, Ikeda F, Miyaike J, et al. Cold activation of serum complement in patients with chronic hepatitis C: study on activating pathway and involvement of IgG. *Acta Med Okayama*. 2001;55:229-35.
70. Pham BN, Mosnier JF, Durand F, Scoazec JY, Chazouilleres O, Degos F, et al. Immunostaining for membrane attack complex of complement is related to cell necrosis in fulminant and acute hepatitis. *Gastroenterology*. 1995;108:495-504.
71. Brown KS, Keogh MJ, Owsianka AM, Adair R, Patel AH, Arnold JN, et al. Specific interaction of hepatitis C virus glycoproteins with mannan binding lectin inhibits virus entry. *Protein Cell*. 2010;1:664-74.

-
72. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, et al. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet.* 2005;37:835-43.
73. Banerjee A, Mazumdar B, Meyer K, Di Bisceglie AM, Ray RB, Ray R. Transcriptional repression of C4 complement by hepatitis C virus proteins. *J Virol.* 2011;85:4157-66.
74. Dumestre-Perard C, Ponard D, Drouet C, Leroy V, Zarski JP, Dutertre N, et al. Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:131-6.
75. Seemayer CA, Gaspert A, Nickleit V, Mihatsch MJ. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:568-76.
76. Bellamy CO. Complement C4d immunohistochemistry in the assessment of liver allograft biopsy samples: applications and pitfalls. *Liver Transpl.* 2011;17:747-50.
77. Descamps V, Op de Beeck A, Plassart C, Brochet E, Francois C, Helle F, et al. Strong Correlation between Liver and Serum Levels of Hepatitis C Virus Core Antigen and RNA in Chronically Infected Patients. *J Clin Microbiol.* 2011.
78. Guerrero RB, Batts KP, Brandhagen DJ, Germer JJ, Perez RG, Persing DH. Effects of formalin fixation and prolonged block storage on detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *Diagn Mol Pathol.* 1997;6:277-81.

-
79. Chung JY, Braunschweig T, Williams R, Guerrero N, Hoffmann KM, Kwon M, et al. Factors in tissue handling and processing that impact RNA obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 2008;56:1033-42.