



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Aline Márcia Marques Braz

**Interação entre Citocinas, Plaquetas e Fibrogênese na
Investigação da Metaplasia Mielóide Hepática**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

**Botucatu
2016**

Aline Márcia Marques Braz

Interação entre Citocinas, Plaquetas e Fibrogênese na
Investigação da Metaplasia Mielóide Hepática

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Braz, Aline Márcia Marques.

Interação entre citocinas, plaquetas e fibrogênese na
investigação da metaplasia mielóide hepática / Aline
Márcia Marques Braz. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Márjorie de Assis Golim

Coorientador: Paulo Eduardo de Abreu Machado

Capes: 90400003

1. Hepatite C. 2. Metaplasia. 3. Fígado - Doenças.
4. Fígado - Inflamação.

Palavras-chave: Fibrose; Metaplasia; VHC.

Dedicatória

*À minha família e amigos,
fontes de alegria e motivação.*

Agradecimientos

Primeiramente à Deus que me deu força, saúde e perseverança para conseguir mais essa vitória.

À minha princesinha Ana Clara Braz Rosso, pelo amor incondicional e pela compreensão diante das minhas horas de ausência.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim, que desde os meus primeiros passos na vida acadêmica e profissional tem depositado sobre mim confiança, horas de ensinamentos preciosos e conselhos imensuráveis, sempre com muita compreensão e paciência, motivando-me em cada fase a ser superada. Meu exemplo de profissional de sucesso e de gentileza em pessoa.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado pelos ensinamentos, confiança e dedicação.

À Valéria Alves da Silva por sua amizade, apoio técnico e conselhos tão preciosos.

À equipe do Laboratório de Imunohistoquímica da Patologia da FMB-UNESP, especialmente ao supervisor técnico Marcos Roberto Franchi e a Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Custódio Domingues, pelo apoio técnico, sem o qual este trabalho não se concretizaria.

À Caroline Mitiká Watanabe pela amizade e por todo apoio técnico e pessoal, pois dividiu comigo momentos de alegria, tristeza, desânimo e euforia, sempre me motivando a ir mais longe.

À Luana Aparecida Barbosa, minha amiga, sempre pronta a ajudar e a aconselhar em todos os momentos, lamentando minhas quedas e comemorando minhas vitórias, compartilhando de todas as emoções desta caminhada.

À equipe do ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelo auxílio na abordagem dos pacienteS, coleta de dados e amostras.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio técnico.

À Caroline Almeida Lima por sua amizade preciosa, ajuda e dedicação em todas as coletas.

À minha irmã Lílian Marques Braz pelas palavras de motivação e pelo socorro nas horas mais difíceis.

Ao meu pai Edvaldo Braz e minha mãe Fátima Braz pelo amor e apoio incondicional em todas as situações.

Ao Rafael da Silva Marcolino, amigo de longa data, hoje meu namorado, que durante a fase mais difícil da minha caminhada trouxe luz e amor à minha vida, não me deixando desistir e me incentivando a sonhar ainda mais.

À todos os meus amigos do Hemocentro que não só contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, mas que torceram por mim e compartilharam dos meus momentos de alegria e tristeza.

E principalmente aos meus pacientes, motivação maior deste trabalho, que com muita boa vontade e esperança colaboraram para a realização deste, muito obrigada!

Epígrafe

Penumbra da vida

A vida é alvo de vários estudos científicos, filosofias, crenças e inúmeras indagações poéticas, sendo seu valor imensurável e sua pertinência intransferível. Por de traz das paredes onde vivemos “enjaulados” por nós mesmos, a vemos como algo a ser desvendado, e é nessa ocasião que acabamos por nos prender em um foco obsessivo em obter resultados e conclusões, não nos atentando à essência da própria vida. Esquecemos que por de traz dos nossos projetos e ambições, existe uma imensidão de experiências a serem vividas, e acreditando na nossa, muitas das vezes, falha capacidade de entendimento, almejando por “milagres” que possam nos enaltecer. A humanização por muitas vezes é perdida enquanto nos dirigimos com afã àquilo que chamamos de “satisfação pessoal”. Tal pretensão torna-se enleante, visto que quase nunca as pessoas alcançam sua satisfação completa, ao passo que, influenciados ou não pelo capitalismo e pela disputa direta na sociedade atual, almejam cada vez mais poder. Nessa busca desenfreada por satisfação pessoal infinda, acabamos por nos aprisionar em nossas próprias correntes que nos impedem de sermos verdadeiramente felizes, e desfrutarmos dos pequenos detalhes que nos rodeiam. E é quando vemos diante de nós a tênue linha que separa a vida da morte, quando vemos apagar de um olhar o brilho do âmago é que compreendemos: estamos perdendo tempo, pois o relógio corre contra nós que não desfrutamos de tudo aquilo que nos é oferecido tão desinteressadamente. Passamos tão despercebidamente diante de tudo que nos rodeia, que não observamos o esplendor da natureza, a beleza no olhar inocente de uma criança, bem como nos detalhes do sabor dos alimentos. A essência da vida é como o entardecer sob uma grande e

bonita árvore: grandioso, belo e único, além do mais, ele simplesmente está lá, disponível para todos que quiserem admirá-lo enquanto é possível. Por isso, em meio às ocupações diárias, devemos nos atentar que os raios solares que tocam nossa pele, são os mesmos raios que contornam suavemente os ramos das nossas vidas, e não importa o momento que estamos passando na nossa trajetória, temos que ter a certeza de que por de traz da penumbra dos galhos existentes sobre nós, habita um sol forte e grandioso pronto para nos iluminar enquanto é possível. Até que um dia, o entardecer da nossa vida culmine em uma noite sem fim, e não haja mais tempo para quaisquer epílogos.

Aline Braz

Resumo

BRAZ, A. M. M. **Interação entre Citocinas, Plaquetas e Fibrogênese na Investigação da Metaplasia Mielóide Hepática.** 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Vírus da Hepatite C (VHC) é uma das principais causas de doença inflamatória crônica do fígado, com progressão variável para a fibrose e cirrose hepática. Cerca de 30 a 40% dos pacientes com hepatite C crônica tem manifestações extra-hepáticas, sendo uma variedade destas descritas como associadas ao VHC. Quando a produção da medula é incapaz de manter as necessidades do organismo, em reação secundária a doença mieloproliferativa (policitemia vera, leucemia granulocítica crônica), ou até mesmo de origem idiopática, pode ocorrer hematopoese extramedular (HEM), presente mais comumente no fígado, baço e gânglios linfáticos, os quais passam a exercer função hematopoiética. Com o objetivo de avaliar a existência de hematopoese extramedular hepática em pacientes com hepatite C crônica e sua influência na gênese da fibrose hepática, foram avaliados 69 pacientes VHC positivos, os quais foram submetidos à biópsia hepática percutânea, e estratificados em grupos conforme a classificação METAVIR, conforme descrição abaixo: G1 – n = 19: pacientes no estágio F1 (fibrose portal sem septos); G2 – n = 16: pacientes no estágio F2 (septos poucos); G3 – n = 17: pacientes em estágio F3 (septos numerosos sem cirrose); G4 – n = 17: pacientes em estágio F4 (cirrose); G5 - n = 15: indivíduos saudáveis (grupo controle). Foram realizadas quantificações plasmáticas de quimiocinas (CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 e CXCL10) e fatores de crescimento (TGF- β , VEGF, FGF, PDGF) e investigada a presença de HEM em cortes histológicos hepáticos por imunohistoquímica com uso dos marcadores CD61/CD34/FatorVIII. Nossos resultados conduzem para o fato que o VHC pode induzir HEM hepática, de aspecto imaturo, localizada no infiltrado inflamatório peri-portal, demonstrada pelas células de fenótipo CD61⁺/CD34⁺/FatorVIII⁺. Dentre as quimiocinas envolvidas no processo da fibrogênese, observaram-se aumento de todas as concentrações plasmáticas destas proteínas solúveis nos pacientes VHC quando comparado ao grupo controle, sendo de maior relevância as associações positivas observadas entre o grau de fibrose hepática e os níveis de CXCL8 e CXCL10, no entanto, esta última apresenta-se diminuída após o estabelecimento da cirrose (G4). Quanto aos fatores de crescimento circulantes, observou-se associação negativa entre o grau de fibrose e os níveis de PDGF, não sendo observada relação entre os demais fatores de crescimento e os grupos de estudo. Ao fazer estudo comparativo dos pacientes mediante presença ou ausência de HEM hepática, observou-se expressiva redução dos níveis de PDGF nos pacientes com HEM. Esses dados corroboram com nossa hipótese indicando que possa estar ocorrendo acúmulo intra-hepático de plaquetas, e consequentemente de seus produtos. Os indícios da existência da HEM hepática são de suma importância para a maior compreensão dos mecanismos de ação do VHC, os quais são ainda pouco compreendidos, podendo este fenômeno estar contribuindo para a evolução da fibrose hepática nesses pacientes.

Palavras-chave: Fibrose; Metaplasia; VHC.

Abstract

BRAZ, A. M. M. **Interaction Between Cytokines, Platelets and Fibrogenesis in the investigation of Myeloid Metaplasia Liver.** 2016. 65 f. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Hepatitis C Virus (HCV) is a major cause of chronic liver inflammatory disease with variable progression for fibrosis and cirrhosis. About 30 to 40% of patients with chronic hepatitis C has extrahepatic manifestations and a variety of these described as an association with HCV. When the production of the bone marrow is not able to maintain the homeostasis due a secondary reaction to myeloproliferative disease (polycythemia vera, chronic granulocytic leukemia), or idiopathic causes, it may occur an extramedullary hematopoiesis (EMH), most commonly in the liver, spleen and lymph nodes, which can start the development of hematopoietic function. The purpose of this study is the evaluation of existence of liver extramedullary hematopoiesis in patients with chronic hepatitis C, and the influence in the pathogenesis of liver fibrosis. It was evaluated 69 liver biopsy from HCV positive patients and stratified into groups according to METAVIR rating as described below: G1 - n = 19: patients in the F1 stage (portal fibrosis without septa); G2 - n = 16: patients in stage F2 (few septa); G3 - n = 17: patients with stage F3 (numerous septa without cirrhosis); G4 - n = 17: patients in stage F4 (cirrhosis); G5 - n = 15: healthy individuals (control group). It was quantified the chemokines (CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 and CXCL10) and growth factors (TGF- β , VEGF, FGF, PDGF) from plasma and investigated the presence of EMH in the liver tissue sections by immunohistochemistry use of CD61 / CD34 / Factor VIII markers. The results lead to the fact that HCV can induce liver EMH in the immature form, located in peri-portal inflammatory infiltration, demonstrated by the presence of phenotype of cells CD61 + / CD34 + / Factor VIII +. All chemokines concentrations involved in the fibrogenesis process are increased when compared to the control group. Relevant positive associations were observed between the degree of liver fibrosis and the chemokines CXCL8 and CXCL10 levels, however, the CXCL10 has to be decreased after the establishment of cirrhosis (G4). There was a negative association between the degree of fibrosis and the growth factor PDGF, not being observed the relationship between the other growth factors and study groups. When created a comparative study of patients by presence or absence of liver EMH, there was a significant reduction in the levels of PDGF in patients that has EMH. These data corroborate the hypothesis that occurs intrahepatic platelet accumulation and presence of their products in the liver. Evidence of the existence of liver HEM are extremely important for a better understanding of mechanisms of HCV action, which are still poorly understood. This circumstance can contribute to the development of liver fibrosis in these patients.

Key-Words: Fibrosis; HCV; Metaplasia.

Lista de Figuras

Figura 1- O ciclo de infecção de VHC	19
Figura 2 - Alterações da estrutura hepática associada com a fibrose hepática avançada	20
Figura 3 - Mecanismos celulares da fibrose hepática.....	25
Figura 4 – Fluxograma do provável ciclo infeccioso.....	30
Figura 5 - Representação da expressão de marcadores em cortes histológicos hepáticos por imunohistoquímica.....	38
Figura 6 - Número de plaquetas circulantes com relação ao estágio de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.....	40
Figura 7 - Níveis de quimiocinas plasmáticas nos grupos (pg/mL). A) CXCL9; B) CXCL10; C) CXCL8; D) CCL2; E) CCL5.....	43
Figura 8 - Níveis de fatores de crescimento nos grupos (pg/mL). A) PDGF; B) VEGF; C) FGF	47
Figura 9 - Níveis de PDGF em pacientes com presença ou ausência de hematopoese extramedular (pg/mL)	50
Figura 10 - Número de plaquetas periféricas nos pacientes com presença ou ausência de hematopoese extramedular	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização amostral segundo classificação METAVIR.....	33
Tabela 2 - Caracterização demográfica da amostra.....	33
Tabela 3 - Anticorpos primários pesquisados nas biópsias hepáticas, respectivos clones e diluição.....	36
Tabela 4 - Caracterização demográfica da amostra do ensaio de imunohistoquímica.	37
Tabela 5 - Dosagens de citocinas, quimiocinas plasmáticas (mediana, percentil 25 e percentil 75) e número de indivíduos distribuídos nos grupos.....	42

Lista de Abreviações

ADP: Adenosina Difosfato
ALT: Alanina Aminotransferase
ATP: Adenosina Trifosfato
DAB: 3,3-diaminobenzidina
ECM: Matriz Extracelular
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos
HEM: Hematopoese Extramedular
HGF: Fator de Crescimento de Hepatócitos
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
HSC: Células Estreladas Hepáticas
IMH: Imunohistoquímico
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1: Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
OMS: Organização Mundial de Saúde
PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
SR-B1: Receptor *Scavenger* tipo B 1
TGF- β : Fator de Crescimento Transformante- β
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VHB: Vírus da Hepatite B
VHC: Vírus da Hepatite C

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	SUJEITOS	33
3.2	INSTRUMENTOS	34
3.3	PROCEDIMENTOS	35
4	RESULTADOS	37
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICES	61
	APÊNDICE A	61
	APÊNDICE B	62
	ANEXOS	64
	ANEXO A	64

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) há cerca de 130 a 150 milhões de pessoas com hepatite C crônica no mundo, e um número significativo destas irá desenvolver cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), porém estima-se que este número seja maior, podendo chegar a 185 milhões de pessoas no mundo (PYBUS et al., 2015). Dentre as mortes causadas por hepatites virais no Brasil no período de 2000 a 2011, o maior número foi em decorrência da hepatite C, com 16.896 óbitos (DST-AIDS HEPATITES VIRAIS, 2012).

Vírus da Hepatite C (VHC) é uma das principais causas de doença inflamatória crônica do fígado, com progressão variável para a fibrose e cirrose hepática (ELSENHARDT et al., 2012; ANJO et al., 2014). É um vírus de transmissão parenteral, sendo suas principais vias de transmissão através de transfusão sanguínea ou de hemoderivados contaminados, uso compartilhado de agulhas e seringas (geralmente por usuários de drogas intravenosas) e reutilização ou esterilização inadequada de equipamentos médicos ou de cuidados de saúde. O VHC também pode ser transmitido sexualmente ou através de transmissão vertical, no entanto, estas vias são menos comuns (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; ROSSI et al., 2015). Portanto, os indivíduos considerados de risco são aqueles que receberam transfusões de sangue e/ou hemoderivados antes de 1992, usuários de drogas intravenosas, pessoas com tatuagens e *piercings*, portadores de HIV (*Human Immunodeficiency Vírus*), transplantados, hemodialisados, hemofílicos, presidiários e sexualmente promíscuos (POZZETTO et al., 2014).

A hepatite C aguda é uma infecção de curto prazo que ocorre durante os primeiros seis meses após a exposição ao VHC. É caracterizada por elevados níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e icterícia, que aparece em cerca de 25% dos casos. Cerca de 80% dos casos agudos de hepatite C são assintomáticos, portanto, difíceis de diagnosticar e estabelecer precisamente a data do início da infecção. Cerca de 70% a 80% dos pacientes com infecção aguda desenvolvem hepatite C crônica (AMAN et al., 2012). Apenas 15% a 25% das pessoas infectadas realizam o *clearance* viral espontâneo dentro de seis meses de infecção sem qualquer tratamento (HAJARIZADEH et al., 2013).

A hepatite C crônica é oficialmente diagnosticada pela presença de anti-VHC e elevação dos níveis séricos de ALT por mais de seis meses. Mesmo na fase crônica, a maioria dos pacientes não apresentam sintomas até que as complicações surjam, embora muitas vezes estas demorem até 20 anos após a infecção para ocorrerem (AMAN et al., 2012). Esta fase da infecção costuma apresentar amplo espectro clínico, desde formas com enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001).

1.1 O Vírus da Hepatite C

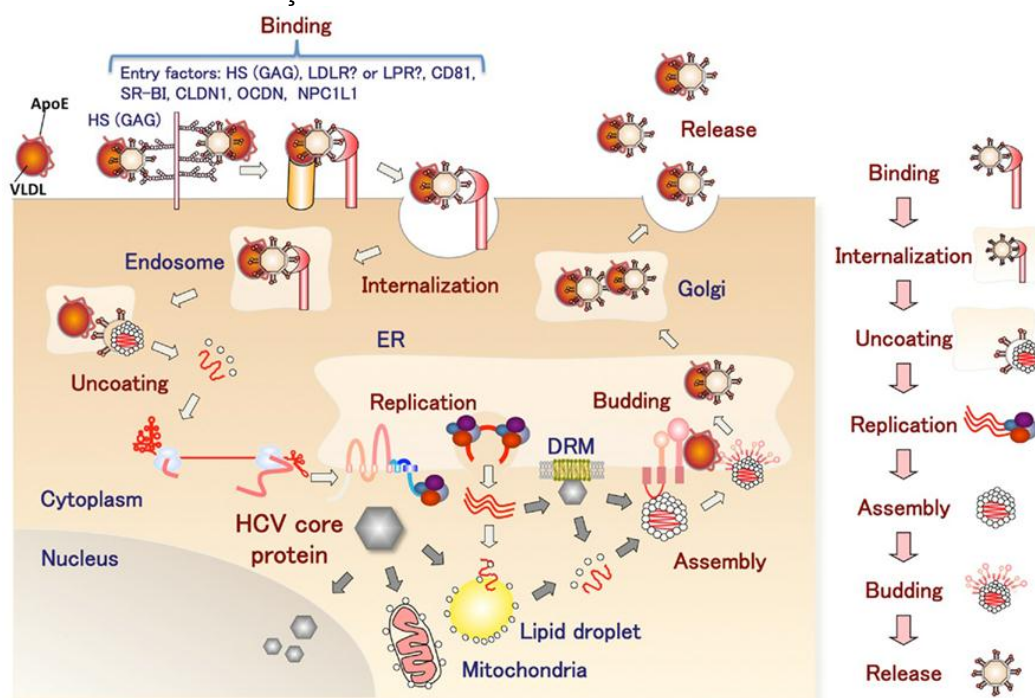
O VHC pertence ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. É um vírus pequeno, envelopado, de RNA de cadeia simples. Uma de suas principais características é a heterogeneidade genética. Existem descritos sete genótipos maiores do VHC e 67 subtipos, porém 60% dos casos ocorrem devido à infecção pelos subtipos 1a e 1b (CARLSEN et al., 2013; SMITH et al., 2014; LYU et al., 2015). No Brasil os genótipos mais frequentemente encontrados são os genótipos 1, genótipo 3, seguido respectivamente do genótipo 2 (LIANG et al. 2000; STRAUSS, 2001; BASSETI-SOARES, 2006; SKLAN et al., 2009). Os casos de infecção pelo vírus de genótipo 1 representam mais de 70% de todos os casos de infecção crônica (LAWITZ et al., 2013).

O genoma do vírus da hepatite C é composto por RNA de polaridade positiva. Tal molécula linear codifica uma poliproteína precursora que durante a replicação viral é clivada por enzimas virais e do hospedeiro em proteínas estruturais do core: E1, E2 (do envelope) que são componentes essenciais para o vírus, e proteínas não estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, associadas ao ciclo de vida do VHC. (XU et al., 2001; VARAKLIOTI et al., 2002)

As proteínas do envelope possuem impacto fundamental na entrada do vírus na célula, podendo constituir potenciais alvos para o tratamento do VHC (CARLSEN et al., 2013), como por exemplo, os inibidores de protease de segunda onda, os quais oferecem várias vantagens sobre as drogas anteriormente disponíveis, pois baseiam-se em mecanismos de ação direta contra proteínas virais, como por exemplo, o Sofosbuvir, um inibidor da polimerase NS5B do VHC, e o Simeprevir, um inibidor da protease NS3/4A (CLARK et al., 2013).

Até onde se sabe, a internalização do VHC na célula ocorre por endocitose, iniciada por interações específicas entre E1 e E2, e receptores na superfície da célula hospedeira, que induzem a fusão do envelope viral à membrana plasmática da célula hospedeira. A proteína do tipo tetraspanina, CD81, é o principal veículo de entrada do vírus, porém Claudina-1, ocludina, receptor *scavenger* tipo B1 (SR-B1), receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e glicosaminoglicanos foram identificados como outros fatores que atuam na entrada do vírus na célula alvo (KUPFER, 2010) (Figura 1).

Figura 1- O ciclo de infecção de VHC



O vírus se liga a um complexo de fatores de entrada na superfície de hepatócitos e, em seguida, entra nas células por endocitose. Após desencapsulamento, a replicação viral é realizada no retículo endoplasmático. Em seguida, o nucleocapsídeo viral liga-se ao VLDL e este complexo é liberado pelas células infectadas.

Fonte: MORIISH; MATSUURA, 2012.

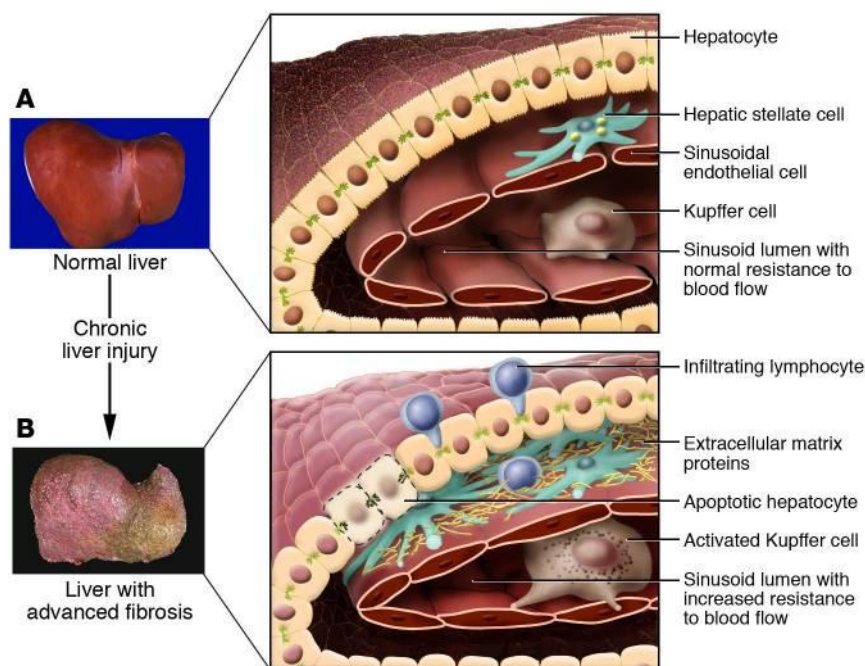
1.2 Fibrogênese

Após a infecção, diversos mecanismos da resposta imune são desencadeados com o objetivo de controlá-la (BASSETI-SOARES, 2006). A inflamação tem papel fundamental no sentido de aumentar o número de fagócitos no foco infeccioso, ampliando sobremaneira as chances de eliminação do vírus. Neste processo, linfócitos T *helper* liberam citocinas ativadoras de macrófagos. Os

macrófagos, assim ativados, potencializam a capacidade de eliminar micro-organismos, e esse mecanismo é particularmente importante na defesa contra parasitas intracelulares. Por outro lado, a ativação persistente dos macrófagos pode induzir fibrose através de mecanismos usados para regenerar os tecidos (Figura 2) (CALICH; VAZ, 2009; SAHA; SZABO, 2014).

Ocorrem então, lesões hepáticas pelo reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição, pois o processo inflamatório contínuo e ineficaz na erradicação viral ocasiona mecanismos para regenerar tais lesões, e no lugar do tecido hepático normal é depositado tecido fibroso (STRAUSS, 2001; MARTINEZ-ESPARZA et al., 2015). O equilíbrio entre a regeneração do tecido hepático e a degradação da matriz fibrótica irá culminar na recuperação tecidual ou em cirrose hepática (MARTINEZ-ESPARZA et al., 2015).

Figura 2 - Alterações da estrutura hepática associada com a fibrose hepática avançada



Após lesão hepática crônica, observa-se infiltrado inflamatório linfocítico no parênquima hepático, alguns hepatócitos em apoptose, células de Kupffer e células estelares hepáticas (HSCs) ativadas proliferando-se e secretando grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular. Células endoteliais sinusoidais perdem suas fenestrações, e a contração tônica de HSCs provoca aumento da resistência ao fluxo sanguíneo no sinusóide hepático.

Fonte: BATALLER; BRENNER, 2005.

Existem fatores que podem influenciar na progressão mais rápida da fibrose na hepatite C crônica, como o gênero (sexo masculino), idade no momento da infecção, consumo de álcool, co-infecção com HIV e vírus da hepatite B (VHB),

diabetes *mellitus* e obesidade (SILVA et al. 2012). Além disso, embora o genótipo do VHC circulante seja um forte preditor da resposta virológica sustentada durante o tratamento, sua influência na progressão da hepatite C crônica ainda é controversa (SILVA et al., 2005). A progressão da fibrose leva à distorção da arquitetura hepática e à cirrose (VISO, 2004), considerando que o fígado normal, é um órgão esponjoso e macio ao toque, e como consequência da cicatrização de lesões causadas pelo VHC e pela ação do sistema de defesa do organismo, passa a enrijecer-se (cirrose) (ZORZETTO, 2011).

O acúmulo intra-hepático de tecido fibroso isola lóbulos hepáticos normais, dificultando a troca metabólica entre estes e o contato entre os hepatócitos e os sinusóides sanguíneos. Este processo, quando avançado, resulta em perda de função hepática progressiva, podendo levar a óbito (MARTINEZ-ESPARZA et al., 2015).

A biópsia hepática é o exame padrão ouro para avaliação da severidade das doenças hepáticas crônicas, incluindo a hepatite C, auxiliando no estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica (AMARAL, 2011), pois permite identificar o grau de envolvimento histológico da doença, de tal forma que se pode avaliar o estadiamento estrutural e necroinflamatório apresentado pelo paciente. Patologistas brasileiros utilizam um padrão para estadiamento e graduação das hepatites crônicas, a classificação Metavir, que é um escore de classificação semiquantitativo de fibrose. A pontuação da fibrose é avaliada numa escala de cinco pontos (F0 = sem fibrose, F1 = fibrose portal sem septos, F2 = septos poucos, F3 = septos numerosos sem cirrose, F4 = cirrose) (POYNARD et al., 1997; KAPLAN; BONIS, 2012).

1.3 Manifestações Extra-Hepáticas da Hepatite C

A infecção pelo VHC está associada com diversas manifestações extra-hepáticas, como neuropatias, doenças autoimunes, crioglobulinemia mista, síndrome de Sjögren, manifestações hematológicas, doença renal, diabetes mellitus, entre outras, acometendo cerca de 30 a 40% dos pacientes VHC⁺ crônicos (KONG et al., 2012; KUPFER, 2010).

Segundo Amaral et al. (2011), a redução de plaquetas no sangue periférico (trombocitopenia), uma condição frequente nos pacientes VHC⁺ crônicos,

é um indicador do estágio de fibrose hepática, porém a causa de tal trombocitopenia podem ser originária de vários mecanismos, porém, estes não estão completamente esclarecidos (ASSINGER, 2014).

1.3.1 Plaquetas

As plaquetas são células sintetizadas preferencialmente na medula óssea, derivadas a partir da fragmentação citoplasmática de megacariócitos maduros, os quais são oriundos de células-tronco hematopoiéticas multipotentes. Possuem forma discóide e estrutura anucleada que contêm grande número de grânulos secretores (MURATA et al., 2014).

Apesar de serem desprovidas de DNA, as plaquetas contêm RNA mensageiro derivado dos megacariócitos e a maquinaria necessária para a síntese de tais proteínas. Portanto, além da sua função bem conhecida na trombose e hemostasia, contribuem para a ativação do endotélio e modulação de respostas inflamatórias (BADIMÓN et al., 2009).

As plaquetas, após a ativação, secretam uma infinidade de moléculas bioativas incluindo mediadores pró e anti-inflamatórios (LEE et al., 2014). Cada grânulo contém substâncias de secreção, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), serotonina, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), etc. Vários efeitos positivos são conhecidos, como hemostasia, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos. Por outro lado, existem alguns efeitos negativos da degranulação das plaquetas, tais como a inflamação, malignidade e interferência na resposta imune (MURATA et al., 2014).

Acredita-se que plaquetas acumulam-se no fígado em condições patológicas tais como a isquemia/reperfusão, cirrose hepática, colestase, hepatite viral, podendo produzir mediadores solúveis *in situ* podendo estes provocar proliferação de hepatócitos. Acredita-se também que haja interação de plaquetas com células de Kupffer, levando à regeneração hepática, pois células de Kupffer ativadas induzem o acúmulo e ativação de plaquetas no fígado, enquanto que as funções das células de Kupffer são reforçadas pelas plaquetas acumuladas. Além disso, a regeneração hepática é promovida pelo efeito direto dos fatores de

crescimento liberados a partir das plaquetas, além do efeito parácrino de células de Kupffer reforçadas pelas plaquetas (MURATA et al., 2014).

As células-alvo do VHC são os hepatócitos, porém existem relatos da presença do vírus em outras células, como as da medula óssea, dos rins, linfócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas. Além disso, estudos detectaram RNA do VHC em plaquetas (ALMEIDA et. al., 2004; PADOVANI et al., 2013), sendo este encontrado com frequência mais elevada em pacientes com trombocitopenia (60%), do que em indivíduos não trombocitopênicos (35%), sugerindo que o VHC possa estar diretamente envolvido no processo que leva a trombocitopenia (ALMEIDA et. al., 2004, ASSINGER, 2014).

1.3.2 Fibrose: Citocinas/ Quimiocinas e Fatores de Crescimento

Durante a infecção pelo VHC, se o vírus não for erradicado, ocorre a inflamação crônica e progressão da fibrose através da ativação das células estreladas hepáticas. Esse processo caracteriza-se pela produção de quantidades aumentadas de matriz extracelular devido ao desequilíbrio entre síntese e degradação de seus componentes, com aumento significativo de colágeno e outros constituintes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e proteoglicanas, levando à fibrose. É um processo de cicatrização complexo e integrado, associado à destruição do tecido normal e substituição deste por tecido fibroso, podendo comprometer seriamente o funcionamento do órgão. (BARONE, 2004; SEBASTIANI et al., 2014).

As células estreladas hepáticas possuem papel fundamental na imunologia hepática, pois são o principal reservatório de vitamina A, a qual é essencial para a função apropriada do sistema imunológico, além de produzir uma série de mediadores ativos, incluindo citocinas e quimiocinas (MARTINEZ-ESPARZA et al., 2015). São consideradas as principais células pró-fibrogênicas hepáticas, as quais produzem vários tipos de proteínas da matriz extracelular e, quando ativadas, perdem vitamina A e lipídios armazenados, podendo desenvolver fenótipo de miofibroblastos (MARTINEZ-ESPARZA et al., 2015).

A injúria hepática leva à ruptura da homeostase no fígado, resultando em estresse oxidativo com maior produção e liberação de radicais livres extracelulares,

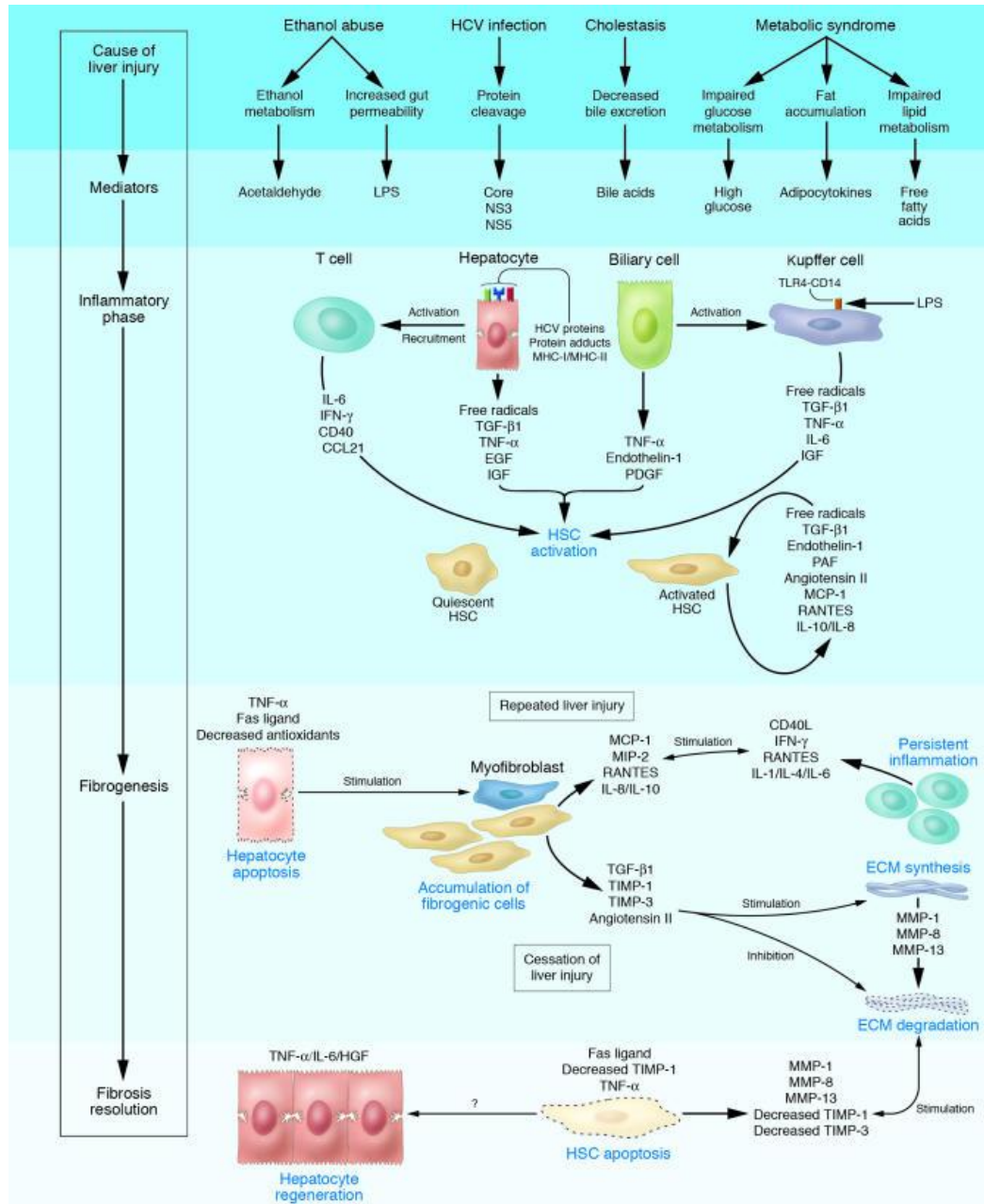
citocinas e moléculas sinalizadoras, como evento primário, ou iniciador da ativação das células estreladas hepáticas e infiltração das células de Kupffer (COUTO, 2007).

Atualmente, maior atenção tem sido dada ao papel de citocinas e fatores de crescimento, tais como aqueles produzidos por leucócitos, plaquetas, ou sintetizados localmente por células epiteliais e mesenquimais que contribuem para o processo fibrogênico, induzindo fibroblastos a sintetizarem matriz extracelular (VERRECCHIA; MAUVIEL, 2007; COUTO, 2007). Em nosso laboratório, estudo prévio demonstrou desbalanço entre os níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes VHC+, o que nos levou a incluir esse perfil de análises na investigação da HEM (MAGNONI, 2014).

Fatores de crescimento são polipeptídeos específicos presentes no plasma e em alguns tecidos que regulam a diferenciação e a proliferação celular e, portanto, a regeneração dos tecidos. Exercem papéis fundamentais na regulação da ativação das células estreladas hepáticas, sendo os principais TGF- β , PDGF, fator de crescimento de hepatócitos, fator ativador de plaquetas (COUTO, 2007).

As células estreladas hepáticas (HCS) são um tipo de células mesenquimais, que diante da lesão hepática, passam por uma transformação originando miofibroblastos, e após isso, proliferaram-se rapidamente. Os miofibroblastos, por sua vez, possuem propriedades contráteis e migratórias, e, apresentaram-se como um importante tipo celular responsável pela deposição de matriz extracelular durante a fibrose/cirrose (Figura 3). HSCs ativadas e miofibroblastos produzem uma série de citocinas pró-fibróticas e fatores de crescimento que perpetuam o processo fibrótico através de efeitos parácrinos e autócrinos (CAMPBELL et al., 2005).

Figura 3 - Mecanismos celulares da fibrose hepática



A injúria hepática pode ser causada por vários fatores, incluindo o VHC. Hepatócitos e células biliares lesionados liberam citocinas inflamatórias e fatores solúveis que ativam células de Kupffer, e estimulam o recrutamento de células T ativadas, proporcionando a formação de um ambiente inflamatório, a ativação de HSCs residentes e sua diferenciação em miofibroblastos fibrogênicos. Se a lesão persiste, ocorre acúmulo portal de HSCs ativadas e miofibroblastos, levando ao aumento da síntese de matriz extracelular, favorecendo a fibrogênese. Se a causa da lesão hepática é interrompida, a fibrose pode ser resolvida com apoptose das HSCs ativadas e regeneração dos hepatócitos. O colágeno pode ser degradado por aumento da atividade de metaloproteínases induzida por diminuição da expressão de TIMP, CCL21, MCP-1; MIP-2, proteínas não estruturais do VHC (NS3 e NS5) e fator de ativação plaquetária (PAF).
 Fonte: BATALLER; BRENNER, 2005.

Os mecanismos fibrogênicos dependem da interação de muitas citocinas pró e anti-fibróticas e/ou inflamatórias. A hierarquia dos fatores de crescimento pró-

fibrogênicos inclui PDGF e TGF- β , com vários efeitos sobre o volume da matriz extracelular (ECM), apoptose hepatocelular, proliferação e regeneração do fígado, inflamação, imunossupressão e carcinogênese. Outros fatores externos, também podem atuar como VEGF, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), entre outros (Gressner; Gressner, 2008).

O Fator de Crescimento de Fibroblastos é secretado por hepatócitos em regeneração, células ovas e células de Ito. Tem efeito mitogênico em cultura de células hepáticas, mas parece atuar em hepatócitos específicos, uma vez que nem todas as células respondem ao estímulo gerado pelo FGF (JESUS et al., 2000).

Gressner e Gressner (2008) relatam que ligações covalentes e não covalentes de moléculas da matriz extracelular, tais como fibronectina, proteoglicanos e colágenos foram descritas anteriormente com relação a uma variedade de fatores de crescimento pró-fibrogênicos incluindo TGF- β , PDGF, FGF, entre outros.

O PDGF é conhecido por desempenhar papel importante na cura de lesões. Sabe-se que a expressão PDGF no desenvolvimento da fibrose hepática resulta na deposição de colágeno em um padrão pericelular e perivenular (CAMPBELL et al., 2005). O PDGF constitui o principal mediador e regulador dos estímulos proliferativos, sendo que o processo proliferativo amplifica efetivamente o número de células fibrogênicas no fígado. A produção de matriz pelas células estreladas hepáticas ativadas é estimulada, principalmente, pela ação do TGF- β produzido pelas células estreladas hepáticas, células de Kupffer e plaquetas (COUTO, 2007). Existe a hipótese que PDGF seja um iniciador da fibrose, porque a sua superexpressão não só parece resultar em fibrose hepática, mas também induzir a expressão de genes pró-fibróticos (TGF). Níveis elevados de PDGF e TGF apresentam relação com proliferação de células sinusoidais, deposição de colágeno, além de indução da expressão de genes, sugerindo que a superexpressão de PDGF perpetua a ativação de HSCs *in vivo* (CAMPBELL et al., 2005).

Quimiocinas são pequenas citocinas reguladoras da quimiotaxia das células imunes no organismo em condições fisiológicas e patológicas. As quimiocinas estão ainda envolvidas na ativação de células imunes, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, além de atuar na embriogênese e angiogênese, no desenvolvimento de tumores e cicatrização de feridas. A produção de quimiocinas inflamatórias é induzida em resposta a sinal imunológico, infeccioso

ou inflamatório, com a função de regular o recrutamento de subpopulações específicas de células efectoras nos sítios de inflamação (WALD et al., 2007).

O equilíbrio entre as diferentes quimiocinas determina o padrão de resposta predominante e a composição das subpopulações celulares do sistema imune residentes no interior do tecido. Em condições patológicas, como infecções virais, este equilíbrio pode ser desfeito. Diante da infecção pelo VHC, tal afirmação evidencia a importância da atuação das citocinas e quimiocinas na regulação dos processos de inflamação crônica, regeneração e fibrogênese (WALD et al., 2007). Neste contexto, as quimiocinas podem potencializar a fibrogênese através de quimiotaxia de células fibrogênicas e amplificação da resposta inflamatória (SEBASTIANI et al., 2014).

Durante a hepatite crônica, uma série de processos é desencadeada no intuito de realizar a eliminação do VHC. Porém, outros processos ainda pouco compreendidos podem acontecer diante da infecção viral, dificultando o esclarecimento completo da história natural da hepatite C crônica, tanto no aspecto intra como extra-hepático.

1.3.3 Metaplasia Hepática

Durante a gestação, a hematopoese embrionária acontece de forma diferenciada da hematopoese do adulto. Ainda no período mesoblástico, células tronco pluripotentes e precursores eritróides são produzidos a partir de células mesenquimais embrionárias do saco vitelino, presentes nos estágios precoces da gestação a partir do 16º ou 19º dia de vida intrauterina. A eritropoese neste período é essencialmente megaloblástica, caracterizada por uma hematopoese extraembrionária, permanecendo este mesoblástico ativo até a 10ª ou 12ª semana de vida intrauterina. O período hepático da hematopoese fetal inicia-se ao redor da 6ª semana gestacional, no período da produção coriônica ou vitelínica das células vermelhas. Do 3º ao 5º mês de gestação precursores mielóides e megacariocíticos já estão presentes, enquanto que os precursores eritróides já representam 50% das células nucleadas do fígado. Concomitantemente, outros órgãos desenvolvem-se assumindo a função hematopoiética, como timo, baço e gânglios linfáticos. A hematopoese visceral atinge o seu pico ao redor do 3º e 4º mês de gestação, declinando progressivamente entre o 6º e 7º mês. Na 10ª semana, inicia-se o

período mielóide, no qual já se pode detectar precocemente em alguns ossos longos a formação de algumas células hematopoiéticas, mas esta função inicia-se efetivamente ao final da 12ª semana. Na 30ª semana de vida todas as linhagens celulares já se encontram representadas na medula óssea com 100% de celularidade (ZANICHELLI et al., 1995; TAVIAN; PÉAULT, 2005).

A metaplasia mielóide caracteriza-se pela hematopoese extramedular como mecanismo de compensação, onde células sanguíneas são produzidas em outros órgãos além da medula óssea. Esta pode ocorrer de origem idiopática, denominada metaplasia mielóide idiopática, ou pode ser secundária à doença mieloproliferativa como policitemia vera ou leucemia granulocítica crônica (metaplasia mielóide agnogênica). Metaplasia mielóide agnogênica e metaplasia mielóide secundária compartilham as mesmas características clínicas com lenta esplenomegalia progressiva, esfregaço de sangue periférico com leucoeritroblastos e substituição da medula óssea por fibrose. Uma complicação menos documentada, mas frequentemente citada é a hematopoese extramedular hepática compensatória maciça (TOWELL; LEVINE, 1987).

A terminologia utilizada para designar HEM têm-se apresentado confusa, pois em muitas vezes esta é referida como metaplasia mielóide. Este termo foi utilizado inicialmente para descrever a HEM secundária à mielofibrose, porém atualmente, convencionou-se que a denominação metaplasia mielóide é utilizada na presença de HEM com difusão de elementos hematopoéticos com predominância de células da linhagem granulocítica, e HEM para designar focos discretos de hematopoese (JOHNS; CHRISTOPHER, 2012).

Diante do exposto, passarei a utilizar o termo HEM para designar a hematopoese-extramedular hepática, pois este enquadra-se como o mais adequado para designar o evento abordado neste trabalho.

Towell et al. (1987) descrevem o caso de um paciente que desenvolveu metaplasia mielóide secundária à policitemia vera, apresentando hepatomegalia e evidência de hipertensão portal desenvolvida num prazo de três meses após esplenectomia. Durante a necropsia observou-se substituição quase que completa do tecido hepático normal por tecido mielóide metaplásico.

Outra etiologia da HEM é a mielofibrose, uma doença mieloproliferativa crônica caracterizada por fibrose da medula óssea (BAROSI, 1999). A associação de mielofibrose com síndrome mielodisplásica é bem conhecida. Pode ocorrer na

mielofibrose idiopática ou na evolução de outras síndromes mieloproliferativas, como a policitemia vera e trombocitemia essencial. O substrato de mielofibrose é o acúmulo de fibras colágenas na medula óssea, incluindo o colágeno tipo III, que são sintetizadas por fibroblastos da medula óssea. Anormalidades celulares e extracelulares de uma variedade de citocinas fibrogênicas têm sido descritas em diferentes desordens mieloproliferativas que estão associadas com mielofibrose. A maior parte destas citocinas e fatores de crescimento, como PDGF, TGF- β , FGF, armazenados nos megacariócitos e grânulos alfa de plaquetas, podem ser liberados tanto no microambiente como no plasma, promovendo mielofibrose (ROSENSTINGL, 2003).

Henry et al. (2014) descreveram um caso de paciente com mielofibrose secundária à deficiência de vitamina D diagnosticada por evidência laboratorial. O paciente também desenvolveu hematopoese extramedular hepática, identificada através da biópsia, com desenvolvimento de ascite secundária como resultado da mielofibrose e da metaplasia hepática.

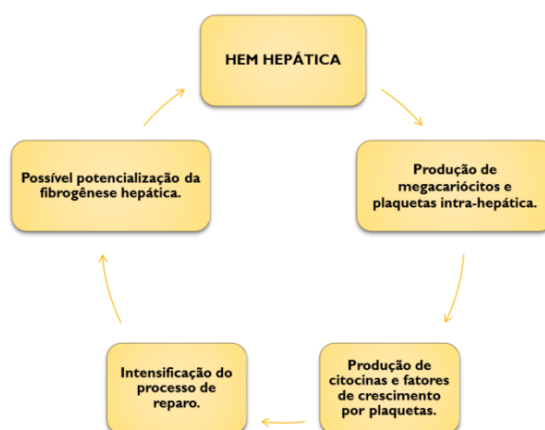
Outro exemplo é o caso relatado por Zimmerman et al. (2008) de paciente com indicação de transplante hepático, por apresentar grande massa tumoral e síndrome de Budd Chiari, no qual foi identificado por estudo microscópico do fígado, presença de abundantes megacariócitos que ocupavam os sinusóides em todos os campos explorados.

Wang et al. (2004) reportaram que condições de trombocitopenia (contagem de plaquetas abaixo de 100.000/ μ L) são frequentemente observadas em pacientes com hepatite C crônica, com prevalência maior naqueles com doença hepática avançada, condições estas ausentes em pacientes com hepatite B. Além disso, observaram também que o nível de ALT sérica elevada foi fortemente associado com trombocitopenia, indicando que possa haver correlação entre dano/fibrose hepática e trombocitopenia, visto que os níveis de ALT no soro são indicadores conhecidos de dano hepatocelular.

Diante do fato de que várias condições patológicas podem desencadear a hematopoese extramedular hepática, levantou-se a hipótese do VHC induzir a reativação/transdiferenciação de hepatócitos, levando estes à sua condição fetal de produtores de hematopoese ou, que células tronco-hematopoéticas presentes no fígado possam ser ativadas à diferenciação megacariocítica, levando à produção local de plaquetas. Este processo de produção de células eritróides e

megacariocíticas no fígado poderia causar acúmulo de plaquetas intra-hepáticas, levando à maior produção e ação de quimiocinas e fatores de crescimento no microambiente hepático, agravando o processo de fibrose. Além disso, as plaquetas produzidas no fígado poderiam servir como rápido e numeroso veículo de infecção pelo VHC de novos hepatócitos, perpetuando assim, o ciclo de infecção hepatócitos/plaquetas/hepatócitos (Figura 4).

Figura 4 – Hipótese da atuação de HEM na fibrogênese hepática



Fonte: material elaborado pelo próprio autor.

A investigação da possível presença da HEM em pacientes com hepatite C crônica baseou-se em alguns fatores:

- ✓ Evidências de que citocinas podem estimular a hematopoiese-extramedular, como por exemplo Mendt e Cardier (2015) que sugerem que assim como na medula óssea, CXCL12 desempenha um papel importante na regulação da migração, recrutamento e manutenção de células tronco e progenitores hematopoiéticos;
- ✓ Que processos contínuos de lesão, inflamação e reparo podem servir de estímulo para a formação de nichos hematopoéticos;
- ✓ A condição de trombocitopenia frequente nos pacientes VHC⁺ crônicos, associada a resultados anteriores de Padovani et al., onde constatou-se a presença do RNA viral do VHC em plaquetas mesmo na ausência de CD81;

Em conjunto, estes fatores justificam a realização de estudo para avaliar a ocorrência de hematopoese extramedular hepática em indivíduos cronicamente infectados com o vírus da hepatite C pelo fato de que tal condição pode intensificar o processo inflamatório/fibrogênico intra-hepático, e consequentemente o agravamento da lesão hepática.

2 Objetivos

Objetivo Principal: Avaliar a existência de hematopoese extramedular hepática em pacientes com hepatite C crônica e sua influência na gênese da fibrose hepática.

Objetivos Específicos

- Avaliar se há reativação da função hematopoética hepática, produzindo células sanguíneas, especialmente megacariócitos produtores de plaquetas.
- Avaliar se há presença de células com fenótipo de megacariócitos em cortes histológicos hepáticos de pacientes VHC+ crônicos através de marcações específicas por imunohistoquímica;
- Avaliar biomarcadores circulantes pela dosagem de citocinas plasmáticas TGF- β , PDGF, VEGF e FGF e associar com o estadiamento de lesão hepática nos pacientes;
- Realizar a quantificação de quimiocinas plasmáticas CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2, CXCL10 e avaliar se há associação dos seus níveis com o grau de lesão hepática nos pacientes comparados ao grupo controle;

3 Materiais e Métodos

3.1 Sujeitos

Este foi um trabalho prospectivo, transversal, no qual foram incluídos 69 portadores crônicos do vírus VHC, genótipo 1, pré-tratamento (*naïve*), atendidos no ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, os quais foram submetidos à biópsia hepática percutânea, quando clinicamente indicada. Os fragmentos de biópsia foram submetidos a procedimentos histopatológicos e separados em grupos conforme a classificação METAVIR, que estratifica os graus de fibrose hepática.

Para padronizar e assegurar a coleta dos dados demográficos e clínicos, desenvolvemos modelo de Ficha Clínica Própria (**Apêndice A**), que inclui:

- Nome, RG, data de nascimento, sexo, grau de fibrose, genótipo, data da biópsia hepática, data do diagnóstico sorológico, data provável do contágio, causas (prováveis) da infecção, avaliação de consumo de álcool (Teste CAGE).

A tabela 1 mostra o número de pacientes em cada grupo, estratificados segundo grau de fibrose (METAVIR):

Tabela 1 - Caracterização amostral segundo classificação METAVIR

Grupo de Estudo	Estadiamento	Descrição	N
G1	F1	F1 (fibrose portal sem septos)	19
G2	F2	Septos poucos	16
G3	F3	Septos numerosos sem cirrose	17
G4	F4	Cirrose	17
Total			69

Paralelamente foram processadas amostras de 15 indivíduos saudáveis, doadores de sangue voluntários, os quais representaram o grupo controle (G5).

O perfil demográfico dos grupos de estudo está sumarizado na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização demográfica da amostra

	G1	G2	G3	G4	G5
Sexo Masculino (%)	47%	56%	76%	65%	73%
Sexo Feminino (%)	53%	44%	24%	35%	27%
Idade (média)	40	52	55	55	37

Para composição dos sujeitos do estudo foram adotados os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão: Pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C, pré-tratamento (*naive*), genótipo 1, de ambos os gêneros e maiores de dezoito anos. Foram incluídos no estudo somente pacientes (**Apêndice B**) e doadores que forneceram Consentimento Livre e Esclarecido por escrito, de acordo com a Resolução 466/2012 do CNS - Conselho Nacional de Saúde.
- Critérios de exclusão: Pacientes co-infectados com outras patologias, usuários de drogas de abuso e/ou alcóolatrás, pacientes infectados pelo VHC de genótipo não 1.

O presente trabalho é um subprojeto II de um estudo maior intitulado “Hepatite C – metaplasia mielóide na gênese da fibrose hepática”, o qual obteve parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, local de realização da pesquisa sob o CAAE 4158713.5.0000.5411 e o número de parecer: 1.354.285 (**Anexo A**). As alterações metodológicas necessárias também foram avaliadas pelo CEP e aprovadas em 06/10/2014 (Emenda – Anexo 3).

3.2 Instrumentos

3.2.1 Amostra de sangue periférico

A coleta de amostra de 5mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante (EDTA) foi realizada em um único momento: pacientes pré-tratamento e indivíduos sadios. Esta foi mantida à 4°C imediatamente após a coleta, centrifugada para retirada do plasma, o qual foi aliquotado e congelado à -80°C dentro de 4 horas após a coleta.

3.2.2 Amostras de tecido

As amostras providas de tecido hepático foram coletadas por profissional habilitado durante a realização da biópsia hepática percutânea de rotina, quando clinicamente indicada, realizada com agulha Menghini ou Tru-Cut segundo solicitação médica. Os fragmentos de biópsia foram analisados quando pelo menos oito espaços portais estavam presentes. O tecido foi submetido à coloração hematoxilina-eosina, tricromoMasson, reticulina e emblocados em parafina para demais avaliações. As biópsias foram analisadas por médico patologista, utilizando o sistema METAVIR de classificação.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Dosagens de citocinas e quimiocinas

Para quantificação de quimiocinas e citocinas foram avaliados 69 pacientes (G1: 19; G2: 16; G3: 17 e G4: 17), utilizando kits *CBA Human Chemokine Kit* (CXCL8, CCL5, - por citometria de fluxo com uso do software *BD CellQuest™*.

As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur® (BD), constituído de 4 detectores de fluorescência. Os dados foram analisados com uso do software *FCAPArray®*.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software GraphPad Prism®*. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste U de Mann-Whitney.

3.3.2 Análise imunohistoquímica

O estudo imunohistoquímico (IMH) foi realizado em 48 amostras de biópsia hepática, fixadas e parafinadas, no Departamento de Patologia da FMB-UNESP, perfazendo os grupos: G1 = 16; G2 = 6; G3 = 9; G4 = 17, conforme protocolo que envolve a desparafinização em xilol com passagem em etanol absoluto e hidratação, seguido por bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% e recuperação antigênica em citrato de sódio 0,21% pH 6.0 em câmara de pressão. Em seguida foi realizada a incubação com os anticorpos

primários (tabela 3) e posteriormente com anticorpos secundários (Anti-Mouse/Anti-Rabbit), utilizando-se método de detecção por polímeros. Por fim, foi realizada a revelação com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), a contra-coloração com hematoxilina e desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem em resina sintética. Os anticorpos utilizados na reação foram: Fator VIII, CD61 e CD34.

Os indivíduos inseridos nas análises de IMH não constituem o total amostral incluído no estudo em virtude de material de biópsia insuficiente, coloração com excesso de *background*, ligações inespecíficas, entre outras intercorrências técnicas. Foram pesquisados os marcadores listados no Tabela 3.

Tabela 3 - Anticorpos primários pesquisados nas biópsias hepáticas, respectivos clones e diluição

Anticorpo Primário	Marca/Clone	Diluição
CD34	DAKO/ QBEnd10	1:75
CD61	ZETA/ 2 F2	1:50
Fator VIII	DBS/ F8 86	1:30

4 Resultados

Os indivíduos incluídos nas análises de IMH não constituem o total amostral do estudo (n=69) em virtude de alguns fatores técnicos limitantes, como: material de biópsia insuficiente, coloração com excesso de *background*, ligações inespecíficas, entre outras intercorrências técnicas. Foram então, incluídos nas análises 48 pacientes estando em G1: 16, G2: 6, G3: 9 e G4: 17.

O perfil demográfico dos grupos de estudo está sumarizado na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização demográfica da amostra do ensaio de imunohistoquímica

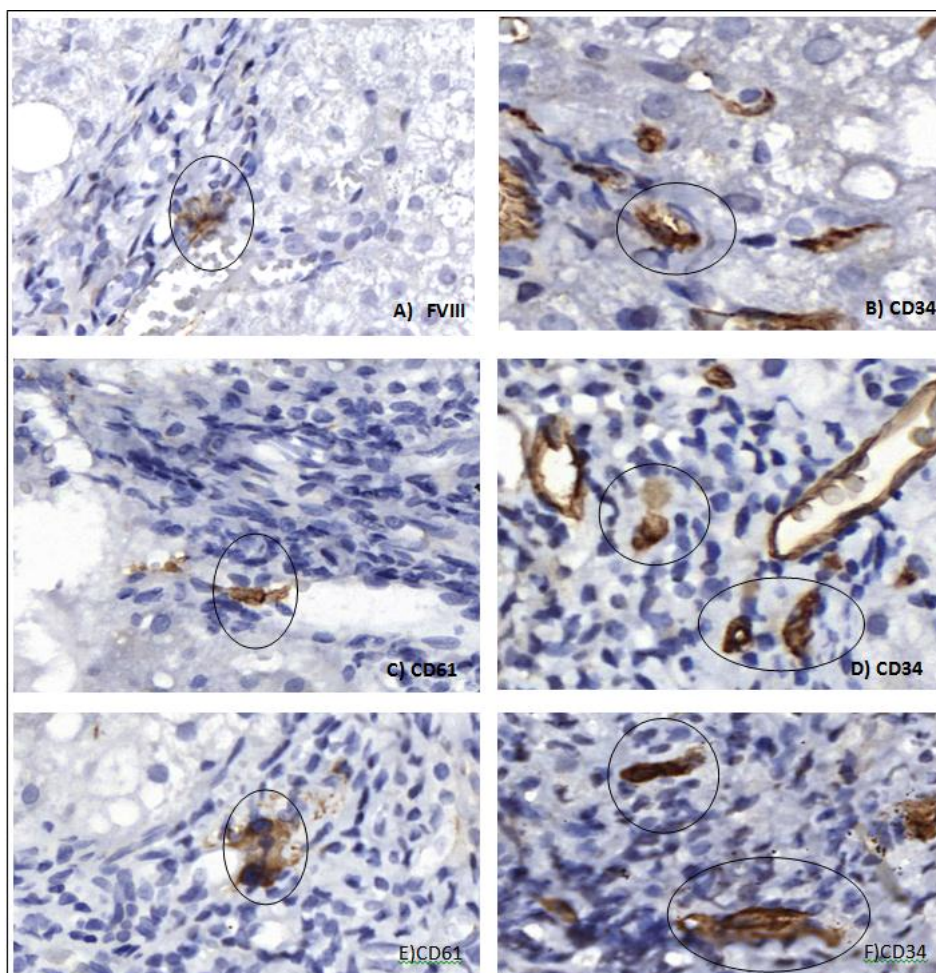
	G1	G2	G3	G4	Total avaliado por IMH (n/ frequência)	Com HEM (n/ frequência)	Sem HEM (n/ frequência)
Sexo Masculino (%)	50%	67%	89%	65%	30 (62%)	16 (62%)	14 (64%)
Sexo Feminino (%)	50%	33%	11%	35%	18 (38%)	10 (38%)	8 (36%)
Idade (média)	39	54	52	55	48	48	49

4.1. Avaliação de HEM hepática nos pacientes VHC+

Nossos resultados indicam que o VHC induz a hematopoese extramedular hepática, de aspecto imaturo, observada no infiltrado inflamatório periportal, com células de fenótipo CD61⁺/CD34⁺/Fator VIII⁺. Tais células teriam sua origem na reativação da função hematopoética fetal hepática, culminando na produção de megacariócitos intra-hepáticos.

Foi realizado estudo observacional e descritivo de cada caso e, em 26 pacientes observaram-se expressões dos marcadores CD34⁺, CD61⁺, Fator VIII⁺ em células com aspecto morfológico imaturo por entre o infiltrado inflamatório periportal, sendo a distribuição entre os grupos: G1=10, G2=4, G3=2 e G4=10 (Figura 5).

Figura 5 - Representação da expressão de marcadores em cortes histológicos hepáticos por imunohistoquímica



Fonte: material elaborado pelo autor.

Legenda: A) e B): Precursor megacariocítico no infiltrado inflamatório. 900X Avidina-Biotina-Peroxidase. C) e D): Precursor megacariocítico no infiltrado inflamatório. 600X Avidina-Biotina-Peroxidase. E) e F): Precursor megacariocítico no infiltrado inflamatório 600X Avidina-Biotina-Peroxidase.

Nossos resultados são relevantes, pois indicam a presença de hematopoese extramedular hepática na infecção crônica pelo VHC, e até o momento não há relatos desta condição durante a hepatite C crônica.

Segundo a literatura, a hematopoese hepática é evidenciada pela presença de células progenitoras mielóides, além de células-tronco hematopoiéticas encontradas no fígado em desenvolvimento (MUENCH et al, 2014). No desenvolvimento hematopoiético fetal, megacariócitos podem ser encontrados entre a 5ª e 6ª semana de gestação no saco vitelino, posteriormente no fígado, e no 3º mês de gestação estão na medula óssea e no sangue. As plaquetas, por sua vez,

são observadas por volta da 11^a semana aumentando em número rapidamente, até atingirem concentrações semelhantes as do adulto (ZANICHELLI et al., 1995).

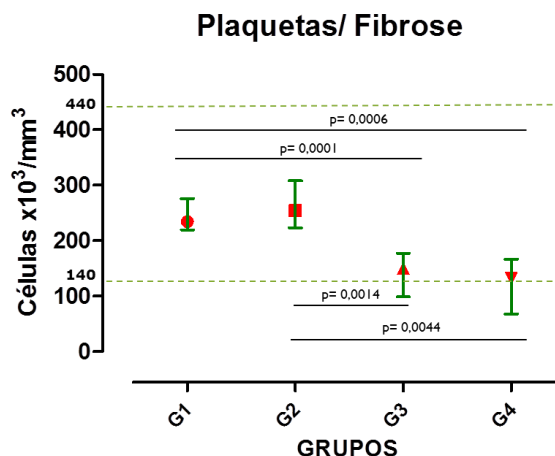
A hematopoese extramedular é a formação ou reativação de nichos de células-tronco hematopoiéticas em outros órgãos fora da medula óssea, semelhante à hematopoese fetal. Estudos recentes relatam a ocorrência de HEM em locais de lesão tecidual, inflamação e reparo, além da sua possível relação com a produção excessiva de quimiocinas (JOHNS; CHRISTOPHER, 2012; CHIU et al., 2015), e nossos resultados sugerem que um processo semelhante poderia estar ocorrendo durante a infecção crônica pelo VHC.

As condições do microambiente hepático, tais como subpopulações residentes de células, incluindo células-tronco hematopoiéticas, enquadram-se como favoráveis ao início ou reativação de um nicho de células-tronco no fígado, desencadeando HEM. Este processo é favorecido pela produção e liberação de fatores solúveis promovendo a multiplicação destas células-tronco hematopoiéticas. A hematopoese extramedular hepática pode ser causada por diferentes processos patológicos, através da mobilização e estimulação de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, pela ativação e proliferação destas células no órgão, pela estimulação das vias de adesão e sinalização através de quimiocinas, ou até mesmo, através da combinação destes fatores. Apesar de apresentar-se como hematopoese de trilhação, possui o potencial fetal de produção de multilinhagem, podendo também originar um ou dois tipos de células predominantes, a depender da patologia que desencadeou esta condição (JOHNS; CHRISTOPHER, 2012).

Segundo Chiu et al. (2015) a HEM pode ser induzida (modelos animais) por infecções bacterianas, virais ou parasitárias, como o citomegalovírus murino, que leva à esplenomegalia e expansão de ilhas hematopoiéticas no baço de camundongos na fase aguda da doença.

Ao analisarmos o número de plaquetas circulantes dos pacientes, observamos redução significativa destas nos estágios mais avançados de fibrose hepática, condição comumente relatada na literatura (Figura 6).

Figura 6 - Número de plaquetas circulantes com relação ao estágio de fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica



Fonte: material elaborado pelo autor.

Nossos dados corroboram com a literatura, pois Elliott et al. (2002) avaliaram a hematopoese extramedular na mielofibrose e observaram presença de trombocitopenia. Além disso, relataram que mesmo com aumento dos níveis de trombopoetina, o número de plaquetas apresentou-se diminuído, sugerindo que haja relação com a diminuição de c-MPL (receptor da trombopoetina) em megacariócitos, gerando excesso de trombopoetina afuncional e o desenvolvimento de HEM no baço (esplenomegalia). Tais observações nos induzem a questionar se, durante a infecção pelo VHC, isso poderia estar ocorrendo de forma semelhante.

Nossos resultados demonstram a presença de hematopoiese extramedular hepática nos pacientes VHC+, porém seria salutar, realizar o acompanhamento destes pacientes, para avaliar se a HEM acelera a progressão da fibrose.

Os mecanismos exatos que levam ao desenvolvimento de HEM ainda permanecem desconhecidos, porém estudos envolvendo modelos animais demonstraram a ligação entre células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, influenciando sua mobilização ou retenção e auto-renovação ou diferenciação através de contatos célula-célula e produção de fatores de crescimento e quimiocinas (CHIU et al., 2015).

Através da secreção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios, os miofibroblastos (produtores de matriz extra-celular) desempenham importante papel na organogênese, inflamação,

reparo e fibrose na maioria dos órgãos e tecidos (WANDERLEY et al., 2014), pois estes fatores podem atuar como ativadores das células estreladas hepáticas, levando à sua diferenciação em miofibroblastos (SEBASTIANI et al., 2014).

Os elementos celulares presentes no estroma tecidual, bem como em tecidos na fase de granulação, hematomas, isquemia, áreas de neovascularização, e locais de inflamação podem originar microambiente favorável ao desenvolvimento de nichos de HEM, pois fatores moleculares presentes em tais condições podem simular aqueles envolvidos na hematopoese. Várias citocinas e mediadores inflamatórios podem favorecer o aumento do número de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais na circulação periférica que, posteriormente, podem estabelecer-se em outros órgãos e tecidos, participando localmente das respostas inflamatórias/regenerativas (JOHNS; CHRISTOPHER, 2012).

4.2. Perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas em pacientes VHC+

Avaliamos então, o perfil de citocinas e quimiocinas circulantes em pacientes VHC+ e em indivíduos saudáveis, o qual está sumarizado na Tabela 5, que inclui número de indivíduos por grupo, mediana, percentil 25 e percentil 75.

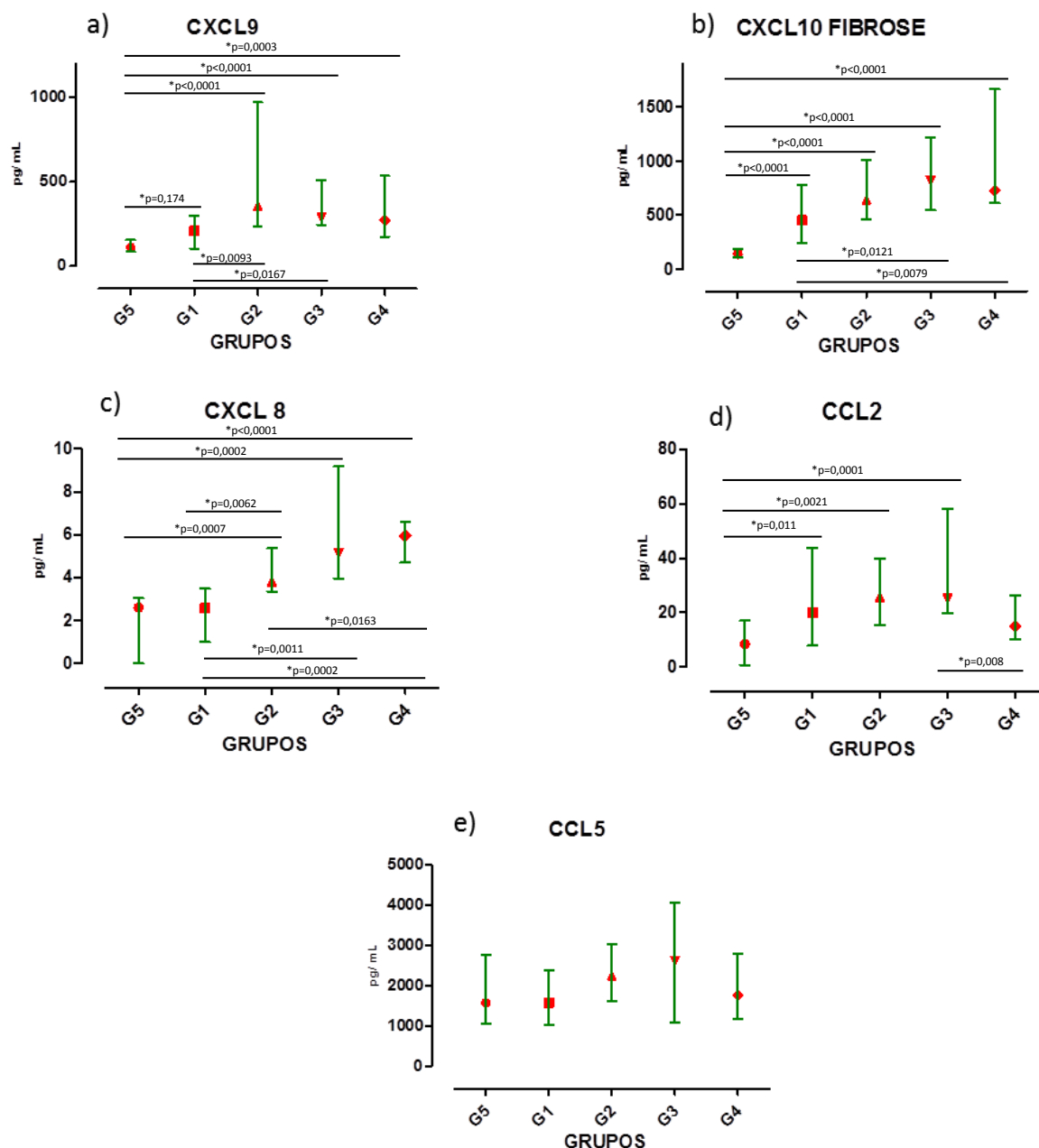
Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software GraphPadPrism®*, através do teste U de Mann-Whitney. Os dados referentes ao TGF- β não estão demonstrados em virtude do kit para quantificação desta citocina não estar em conformidade técnica, impossibilitando as análises plasmáticas.

Tabela 5 - Dosagens de citocinas, quimiocinas plasmáticas (mediana, percentil 25 e percentil 75) e número de indivíduos distribuídos nos grupos

VARIÁVEL	GRUPO	MEDIANA	PERCENTIL 25	PERCENTIL 75	"N"
PDGF	G5	168,6	88,24	294,5	19
	G1	301	49,16	707,1	16
	G2	169,7	38,84	384,6	17
	G3	96,92	42,64	525,8	17
	G4	33,96	2,474	286,9	15
CXCL8	G5	2,62	0	3,04	18
	G1	2,58	0,995	3,488	14
	G2	3,84	3,363	5,365	17
	G3	5,14	3,96	9,175	17
	G4	5,94	4,705	6,605	22
CCL5	G5	1582	1060	2757	18
	G1	1579	1041	2379	14
	G2	2257	1614	3032	17
	G3	2605	1094	4047	17
	G4	1770	1165	2791	22
CCL2	G5	8,505	0,705	17,09	18
	G1	20,04	7,91	43,73	14
	G2	25,81	15,62	39,7	17
	G3	25,22	19,63	58,44	17
	G4	14,92	10,37	26,27	22
CXCL9	G5	110,4	87,73	155,4	18
	G1	208,8	103,6	298,8	14
	G2	356,7	234,7	970,4	17
	G3	288,9	244,8	508,5	17
	G4	270,3	173,1	535,2	22
CXCL10	G5	136,2	107,3	187,7	18
	G1	449,3	232,9	777,6	14
	G2	643,4	455,7	1010	17
	G3	817,1	541,1	1219	17
	G4	726,2	607,7	1661	22
VEGF	G5	2,285	0,99	4,52	18
	G1	2,01	0,9125	5,563	14
	G2	2,415	1,713	6,94	17
	G3	2,82	2,005	6,345	17
	G4	1,73	0,94	5,39	18
FGF	G5	0	0	7,76	18
	G1	0	0	9,125	14
	G2	0	0	16,35	17
	G3	6,58	0	22,52	17
	G4	0	0	20,08	18

As quimiocinas dosadas com uso de *CBA Human Chemokine Kit*, que inclui CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1 e CCL5/RANTES, apresentaram níveis plasmáticos elevados nos pacientes VHC⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Níveis de quimiocinas plasmáticas nos grupos (pg/mL). A) CXCL9; B) CXCL10; C) CXCL8; D) CCL2; E) CCL5. Os valores foram expressos em mediana, percentil 25% e percentil 75%.



Fonte: material elaborado pelo próprio autor.

Dentre as quimiocinas envolvidas no processo da fibrogênese observamos aumento de todas as concentrações plasmáticas destas proteínas solúveis nos pacientes VHC+ com relação aos indivíduos saudáveis, sendo de maior relevância as associações positivas observadas entre o grau de fibrose hepática e os níveis de CXCL8 e CXCL10, no entanto, esta última apresenta-se diminuída após o estabelecimento da cirrose (G4).

Nossos resultados corroboram com a literatura, visto que Neuman et al. (2012) encontraram níveis de CCL5, TNF- α , IL-6, CXCL8, IL-12, TGF- β aumentados em soro de pacientes VHC, comparando estes com grupo controle.

Segundo Wald et al. (2007) estudos demonstraram, através de quantificação de mRNA, aumento de TNF- α e IL-6 intra-hepáticos diante da infecção crônica pelo VHC, assim como das quimiocinas CXCL10, CXCL9, CXCL11, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 e CXCL6, estando os níveis intra-hepáticos de CXCL10 correlacionados com a gravidade da infecção pelo VHC. Semelhantemente aos nossos resultados, os níveis plasmáticos das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 no plasma de pacientes VHC+ também apresentaram-se elevados em comparação com indivíduos saudáveis.

As análises de CXCL9/MIG apresentaram níveis mais relevantes observados no grupo G2 (Figura 4A), demonstrando diferença estatística significativa entre os grupos de pacientes, G1 com G2 e G1 com G3.

Nossos dados obtidos em sangue periférico vão de encontro com estudo de Zeremski et. al (2007), no qual afirmam que durante a hepatite C um maior número de células intra-hepáticas expressa CXCL9/MIG, que está aumentada e correlacionada com maior grau de inflamação, visto que após o estabelecimento da fibrose estes níveis decrescem.

Os níveis plasmáticos da quimiocina CXCL10/IP-10 apresentaram-se diretamente associados à severidade da lesão hepática, no entanto, com diminuição após o estabelecimento da cirrose (G4) (Figura 4B).

De acordo com dados da literatura, esta quimiocina tem sido encontrada em níveis elevados tanto no fígado quanto no soro de pacientes VHC+ comparados com indivíduos saudáveis, condizendo com nossos resultados (ZEREMSKI et. al., 2007; WALD et al., 2007; LARRUBIA et. al., 2008; JOHANSSON et al., 2015). Além disso, trabalhos demonstram que existe correlação positiva das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 com os diferentes graus de fibrose em dosagens intra-hepáticas,

indicando que a persistência da inflamação hepática, produzidas por células mononucleares atraídas por essas quimiocinas, pode indicar a ativação da cascata que causa fibrose hepática (ZEREMSKI et. al., 2007; LARRUBIA et. al., 2008). Nossos dados com mensurações plasmáticas indicam que o comportamento na periferia mantêm-se condizente aos eventos intra-hepáticos.

Semelhantemente à CXCL10, os níveis de CXCL8/IL-8 estão aumentados nos grupos de pacientes em relação ao controle (figura 4C) com diferença estatística deste com G2, G3 e G4. O aumento diretamente proporcional ao grau de fibrose é relevante, visto que está de acordo com outros trabalhos, os quais relatam que em estágios mais avançados de fibrose (F3 e F4) a concentração desta é maior que em estágios iniciais (F1 e F2), sendo indicativa de dano hepático (diferença entre G1 com G2, G3 e G4, e entre G2 e G4) (KUSHNER et. al., 2013; WASMUTH et. al., 2010; JOHANSSON et al., 2015).

As análises da quimiocina CCL2/MCP-1 demonstram que seu aumento apresenta maior concentração no grupo G3 (Figura 4D), havendo diferença estatística entre os grupos, estando $G5 < G1 < G2 = G3$ e $G3 > G4$.

A CCL2 inicialmente foi descrita como responsável pela quimiotaxia de monócitos, porém hoje sabe-se que esta também exerce função quimiotática potente para linfócitos T, além de atuar no controle do recrutamento de células inflamatórias (AJUEBOR et al., 2003) e exercer efeitos diretos em células estreladas hepáticas (WALD et al., 2007).

Diferentemente de nossos resultados, estudos de Kushner et al. (2013) demonstraram que em indivíduos portadores VHC mono infectados não observou-se aumento de CCL2 no soro, mas sua concentração em indivíduos que obtiveram resposta virológica sustentada em relação a indivíduos não respondedores foi maior. Outra observação importante foi em relação a indivíduos co-infectados com HIV, nos quais CCL2 apresentou-se aumentada.

Embora nossos resultados não tenham ido de encontro aos observados por Kushner, pois evidenciamos aumento dessa quimiocina plasmática em pacientes *naïve*, ao estratificarmos os pacientes segundo a classificação METAVIR, observamos aumento acentuado nos grupos G2 e G3, possivelmente devido a constante inflamação periportal.

Constatamos que níveis de CCL5/RANTES estão elevados nos grupos G2, G3 e G4 de pacientes VHC quando comparados ao grupo controle, de acordo

com dados da literatura, apresentando tendência ao aumento desta conforme o avanço da lesão hepática, havendo diminuição dos níveis com o estabelecimento da cirrose. Esta quimiocina está envolvida tanto no processo inflamatório quanto na fibrogênese, sugerindo que esta possa contribuir no monitoramento da fibrose se associada com outros biomarcadores (Figura 5E).

Segundo a literatura, a proteína viral E2 parece induzir a produção de CCL5 por células T CD8+, porém a importância fisiopatológica desta quimiocina diante da hepatite C parece ainda não estar clara (WALD et al., 2007).

Nossos dados de CCL5 vão de encontro com os resultados de Zeremski et al. (2007), que avaliando pacientes com VHC, observaram que a expressão de RANTES intra-hepática está aumentada em hepatócitos e células do epitélio biliar, afirmando que a atividade de CCL5 (RANTES) está associada com o grau de inflamação hepática.

A produção de quimiocinas resulta na ativação de células estreladas hepáticas e na produção de fatores capazes de amplificar o processo inflamatório e perpetuar a atividade de macrófagos, tais como o fator estimulante de colônias de macrófagos (CCL2/ MCP-1), IL-6 e CCL5 (SEBASTIANI et al., 2014).

Segundo Johns e Christopher (2012) a produção de citocinas anormais ou de outros fatores de crescimento hematopoiéticos, induzem populações celulares a se diferenciar em células hematopoiéticas e/ou simular o microambiente hematopoiético.

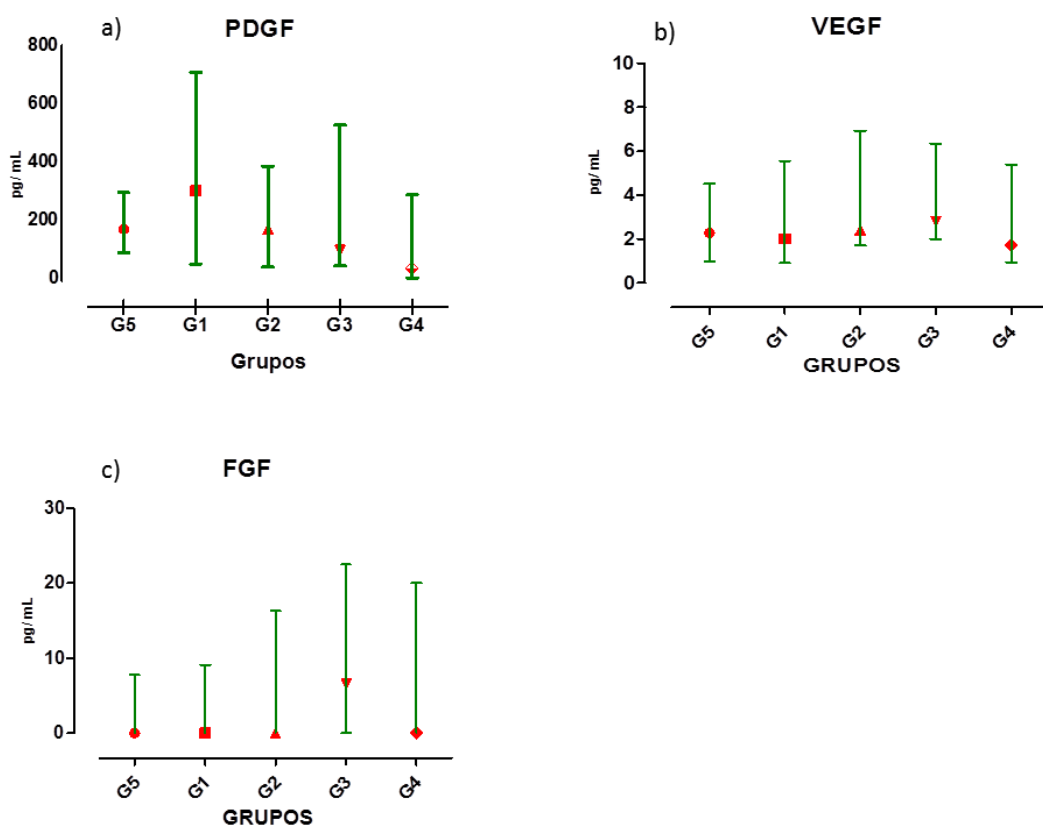
Esta produção anormal de fatores solúveis pode atuar sistêmica ou localmente, fazendo com que a produção excessiva de quimiocinas decorrente da lesão hepática, inflamação e reparo tecidual, hipoteticamente, contribua para o desenvolvimento e manutenção da HEM no fígado dos pacientes com hepatite C crônica.

4.3. Expressão dos fatores de crescimento circulantes TGF- β , PDGF, VEGF e FGF

Durante o processo de regeneração hepática ocorre liberação de citocinas/quimiocinas e fatores de crescimento como, HGF, EGF e FGF, os quais determinam estímulo mitogênico que atinge outras células hepáticas (JESUS et al., 2000).

Realizamos a quantificação de fatores de crescimento VEGF e FGF com uso de *CBA Flex Set*, enquanto que PDGF foi quantificado pela técnica de ELISA (Figura 8).

Figura 8 - Níveis de fatores de crescimento nos grupos (pg/mL). A) PDGF; B) VEGF; C) FGF. Os valores foram expressos em mediana, percentil 25% e percentil 75%.



Fonte: material elaborado pelo próprio autor.

Ao analisarmos os fatores de crescimento circulantes observou-se associação negativa entre o grau de fibrose e os níveis de PDGF. Ao fazer estudo comparativo dos pacientes mediante presença ou ausência de hematopoese extramedular hepática, observou-se expressiva redução dos níveis de PDGF nos pacientes com HEM. Esses dados corroboram com nossa hipótese, indicando que esteja ocorrendo o acúmulo intra-hepático de plaquetas, e consequentemente de seus produtos.

Observou-se aumento de PDGF-AB plasmático em G1 com relação ao grupo controle, com diminuição importante deste conforme o avanço da fibrose

hepática, demonstrando associação inversamente proporcional ao avanço da fibrose (Figura 5A).

Nossos resultados estão de acordo com os resultados encontrados por TANIKAWA (2015), que demonstrou aumentos dos níveis de mRNA de PDGF-A em plaquetas de pacientes com hepatite C crônica, em estágios leves de fibrose (F1+F2), e redução destes em estágios avançados de fibrose (F3 + F4), estando esta relação invertida quando se compara aos níveis deste fator no fígado.

Nossos achados associados aos de TANIKAWA (2015), que avaliou PDGF e TGF tanto em plaquetas quanto no tecido hepático, vem reforçar nossa hipótese de que a ativação de HEM hepática possa estar contribuindo para a progressão da fibrose *in situ*, em virtude da produção plaquetária local.

Células estreladas hepáticas, também chamadas células de Ito, são as principais mediadoras da fibrose hepática e quando ativadas, se transformam em células proliferativas e contráteis, atuando diretamente na resposta fibrótica à agressão hepática. Estas células são ativadas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), pelo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e por citocinas fibrogênicas, tais como TGF- β , angiotensina II e leptina (Correia et al, 2009).

Segundo Oliveira (2009) existem várias moléculas envolvidas no potencial mitogênico das células estreladas hepáticas, como VEGF e EGF, porém o PDGF é conhecido como a citocina mais mitogênica e a que exerce principal ação quimiotática sobre tais células.

Conforme nossos resultados, trabalhos sugerem que durante a lesão do fígado, as células estreladas hepáticas ativadas também produzem PDGF, bem como a expressão de receptores membranares para este, levando a uma retroalimentação à fibrogênese (Friedman, 2008).

Segundo Friedman (2008), um modelo interessante enfatizando a atividade do PDGF no fígado foi realizado utilizando ratos transgênicos, no qual se observou que a expressão de PDGF não só estimula a fibrose, mas também leva ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Ao analisarmos VEGF, este não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apesar da tendência ao aumento de G1 à G3 com queda em G4 (Figura 5B). Semelhantemente, FGF não apresentou diferença significativa, porém observou-se aumento importante em G3 (Figura 5C).

A indução do VEGF contribui para ativação e proliferação de células estreladas hepáticas, bem como a angiogênese hepática, tornando esta molécula elemento fundamental do processo fibrogênico (SEBASTIANI et al., 2014).

O processo fisiopatológico da angiogênese associada à hepatite viral crônica ainda é desconhecido. Existe a hipótese de que a neoformação vascular apresenta papel benéfico na reparação tecidual e regeneração pós-dano hepático, podendo, por outro lado, representar fator de risco da progressão para hepatocarcinoma em pacientes com hepatite C crônica, no entanto, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não estão completamente elucidados. O aumento da expressão de fatores de crescimento de hepatócitos e de VEGF intra-hepáticos encontrados nas hepatites B e C, parece contribuir aumentando a permeabilidade vascular, além disso, VEGF atua mediando a vasodilatação (MAEDA et al., 2008).

Apesar de não observarmos diferença significativa entre os grupos de pacientes nas análises de VEGF, vale ressaltar que em G4 observou-se pela análise histopatológica maior neovascularização, corroborando com os dados descritos na literatura, pois segundo Maeda et al. (2009) na transformação de células do fígado em hepatocarcinoma observa-se microvascularização dos sinusóides, característica geralmente presente no início do processo em que nódulos displásicos passam a receber suprimento arterial, comumente observado em fígados neoplásicos.

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é uma citocina mitogênica que tem sido identificada em células estreladas *in situ*, durante o desenvolvimento e regeneração hepática (FRIEDMAN, 2008). É secretado por hepatócitos em regeneração, células ovas e de Ito (JESUS et al., 2000).

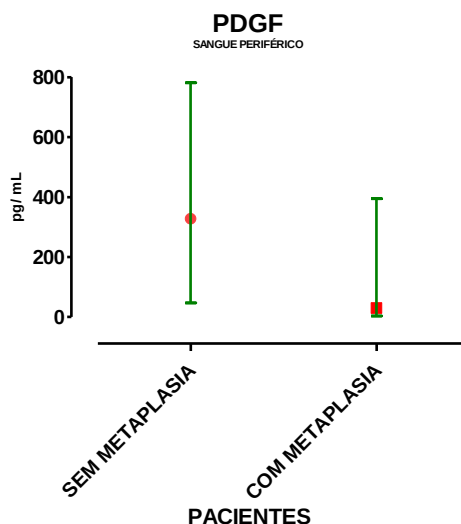
Chang et al. (2008) observaram que a adição *in vitro* de FGF, VEGF ou ambos não foi capaz de induzir resposta migratória de células estreladas hepáticas, não desempenhando papel quimiotático nestas células.

Segundo Johns e Christopher (2012) em estudo com células tronco hematopoiéticas demonstram que o recrutamento de células progenitoras, incluindo as de linhagem megacariocítica, está relacionado com a sinalização de CXCL12 e fator de crescimento de fibroblastos, pois tal complexo parece contribuir para a adesão de progenitores megacariocíticos no local de hematopoese. Apesar de não encontrarmos em nossos resultados diferença estatisticamente significativa de FGF

plasmático, acreditamos que análises intra-hepáticas de FGF possam ser úteis na compreensão da contribuição deste na HEM.

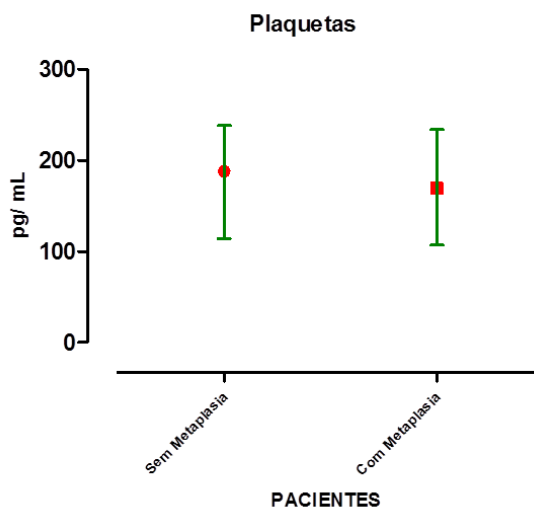
Ao fazer estudo comparativo dos pacientes mediante presença ou ausência de hematopoese extramedular hepática, observou-se expressiva redução dos níveis de PDGF-AB nos pacientes com metaplasia (Figura 9). No entanto, ao avaliarmos o número de plaquetas circulantes destes pacientes, estas permanecem dentro do valor de normalidade, mesmo nos pacientes com HEM, sugerindo que a diminuição dos níveis de PDGF-AB circulante durante a HEM, não está associada ao número de plaquetas periféricas (Figura 10). Esses dados corroboram com nossa hipótese indicando que possa estar ocorrendo o acúmulo intra-hepático de plaquetas, e conseqüentemente de seus produtos.

Figura 9 - Níveis de PDGF em pacientes com presença ou ausência de hematopoese extramedular (pg/mL). Os valores foram expressos em mediana, percentil 25% e percentil 75%.



Fonte: material elaborado pelo próprio autor.

Figura 10 - Número de plaquetas periféricas nos pacientes com presença ou ausência de hematopoiese extramedular



Fonte: material elaborado pelo próprio autor.

Dutra (2014) sugere que TGF- β seja o principal fator envolvido na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, e PDGF seja responsável pela sua maturação. Acredita-se que o PDGF e a liberação de cálcio intracelular possam desencadear efeitos mitogênicos em células estreladas hepáticas (SEBASTIANI et al., 2014).

Plaquetas demonstraram função pró-fibrótica mediada por PDGF-AB e TGF- β 1 na reparação tecidual de feridas e doenças vasculares oclusivas crônicas e agudas, mielofibrose e glomerulonefrite. Além disso, valores significativamente aumentados de PDGF-AB produzido por plaquetas nos pacientes com fibrose na esquistossomose mansônica, sugere que as plaquetas poderiam estar estimulando, de forma mais intensa, a proliferação das células hepáticas responsáveis pela fibrogênese, semelhantemente ao que observamos neste estudo (SOARES et al., 2007).

Jiang et al. (2016) realizaram estudo avaliando o uso de aspirina, um anti-agregante plaquetário, em 1856 indivíduos com doença hepática crônica, utilizando quatro diferentes índices classificatórios de fibrose hepática (FIB4, APRI, FORNS e NFS), e observaram que o uso de aspirina está associado com índices significativamente mais baixos de fibrose hepática em adultos com suspeita de doença hepática crônica.

As evidências de hematopoiese extramedular hepática na infecção crônica pelo VHC, nos levam a acreditar que este fenômeno poderia desencadear a

produção de plaquetas intra-hepáticas, aumento da síntese de quimiocinas e fatores de crescimento intra-hepáticos, servindo de veículo para a reinfeção de novos hepatócitos e outras células suscetíveis ao VHC, perpetuando assim o ciclo infeccioso e contribuindo à progressão da fibrose hepática.

5 Conclusão

- Foi demonstrada a existência de hematopoese extramedular hepática em 26 pacientes com hepatite C crônica do total de 48 avaliados, indicando possível reativação da função hematopoética hepática.
- As células encontradas nos cortes histológicos hepáticos apresentaram perfil fenotípico compatível com megacariócitos.
- Das citocinas plasmáticas avaliadas (PDGF, VEGF e FGF), o PDGF apresentou-se inversamente proporcional ao estadiamento de lesão hepática nos pacientes VHC, estando os maiores níveis circulantes em G1 e G2 (grau leve de fibrose) quando comparados com os grupos G3 e G4 (grau elevado). As demais citocinas não apresentaram diferenças nos grupos de estudo. Quando avaliados os níveis de PDGF quanto a presença ou ausência de HEM hepática, estes apresentaram-se reduzidos naqueles com HEM.
- Nas dosagens de quimiocinas plasmáticas CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2, CXCL10, observou-se aumento de todas nos grupos de pacientes VHC comparados ao grupo controle, especialmente CXCL8 e CXCL10, as quais demonstraram associações positivas com o avanço da lesão hepática.
- O acúmulo de plaquetas intra-hepáticas, o qual pode ser intensificado mediante presença de HEM, pode contribuir para a evolução da fibrogênese no órgão, embora os mecanismos envolvidos na gênese da fibrose hepática não tenham sido avaliados neste estudo.

Referências

- AJUEBOR, M. N. et al. C-C Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Directly Inhibits NKT Cell IL-4 Production and Is Hepatoprotective in T Cell-Mediated Hepatitis in the Mouse. **J. Immunol.**, v. 170, n. 10, p. 5252-259, maio 2003.
- ALMEIDA, A. J. et al. Hepatitis C Virus-associated Thrombocytopenia: A Controlled Prospective, Virological Study. **Ann. Hematol.**, v. 83, n. 7, p. 434-440, fev. 2004.
- AMAN, W. et al. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C. **Virol. J.**, v. 9, n. 57, p. 1-11, 2012.
- AMARAL, I. S. A. et al. Contagem de Plaquetas na Avaliação de Fibrose Hepática. **Rev. Paraense Med.**, v. 24, n. 3/ 4, p. 1-6, 2011.
- ANJO, J. et al. The burden of hepatitis C in Portugal. **GE J. Port. Gastreenterol.**, v. 21, n. 2, p. 44-54, marc./ abr. 2014.
- ASSINGER, A., Platelets and Infection- an Emerging Role of Platelets in Viral Infection. **Front. Immunol.-Inflammation**, v.5, n. 649, P. 1-12, dez. 2014
- BADIMÓN, L. et al. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 62, n. 10, p. 1161-78, 2009.
- BARONE, A. A. Hepatite C – Desenvolvimento de Novas Drogas e Ensaios Clínicos. **II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia da Hepatite C**, p. 48-53, 2004.
- BAROSI, G. Myelofibrosis With Myeloid Metaplasia: Diagnostic Definition and Prognostic Classification for Clinical Studies and Treatment Guidelines. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 9, p. 2954- 70, set. 1999.
- BASSETI-SOARES, E. **Aspectos Fenotípicos Celulares da Imunidade Inata e Adaptativa em Portadores de Hepatite C Crônica com e sem Insuficiência Renal Crônica**. 2006. 100 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, 2006.
- CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 17-57, 2009.
- CAMPBELL, J. S. et al. Platelet-derived Growth Factor C Induces Liver Fibrosis, Steatosis, and Hepatocellular Carcinoma. **PNAS**, v. 102, n. 9, p. 3389-94, mar. 2005.
- CARLSEN, T. H. R. et al. Characterization of Hepatitis C Virus Recombinants with Chimeric E1/E2 Envelope Proteins and Identification of Single Amino Acids in the E2 Stem Region Important for Entry. **J. Virol.**, v. 87, n. 3, p. 1384- 99, fev. 2013.

CHANG, Y. et al. Migration of Hepatic Stellate Cells in Fibrotic Microenvironment of Diseased Liver Model. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, v. 7, n. 4, p. 401-5, ago. 2008.

CHIU, S. et al. Extramedullary Hematopoiesis (EMH) in Laboratory Animals: Offering an Insight Into Stem Cell Research. **Cell Transplant.**, v. 24, n. 3, p. 349-66, fev. 2015.

CLARK, V. C. et al. New Therapeutic Strategies in HCV: Second-generation Protease Inhibitors. **Liver Int.**, v. 33, n. 1, p. 80-4, fev./ 2013.

CORREIA, H. S.T. et al. Níveis Séricos de Globulinas e a Intensidade da Fibrose Hepática em Pacientes com Esquistossomose Mansônica. **Arq. Gastroenterol.**, v. 46, n. 3, p. 194-198, jul./ set. 2009.

COUTO, O. F. M. **Validação e Comparação de Testes Laboratoriais Simples como Preditores de Fibrose Hepática em Portadores de Hepatite C Crônica.** 2007. 47 f. Dissertação (Mestrado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, 2007.

DST-AIDS HEPATITES VIRAIS. **Hepatites Virais em Números.** 2012. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

DUTRA, K. L. **Avaliação da Expressão das Metaloproteinases de Matriz -1, -2 E -9, Presença de Miofibroblastos e Ki-67 em Ameloblastoma.** 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ELLIOTT M. A. et al. Simultaneous Measurement of Serum Thrombopoietin and Expression of Megakaryocyte c-Mpl with Clinical and Laboratory Correlates for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **Eur. J. Haematol.**, v. 68, n. 3, p. 175-179, mar. 2002.

ELSENHARDT, M. et al. The XCR3(+) CD56Bright Phenotype Characterizes a Distinct NK Cell Subset with Anti-Fibrotic Potential That Shows Dys-Regulated Activity in Hepatitis C. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 1-9, jul. 2012.

FRIEDMAN, S. L. Hepáticas células estreladas: Metamorfose, Multifuncional e Células Enigmática do Fígado. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 1, p. 125-172, jan. 2008.

GRESSNER, O. A.; GRESSNER, A. M. Connective Tissue Growth Factor: a Fibrogenic Master Switch in Fibrotic Liver Diseases. **Liver Int.**, v. 28, n. 8, p. 1065-1079, out. 2008.

HENRY, M. et al. Myelofibrosis, Hepatic Extra-medullary Hematopoiesis and Ascites Associated With Vitamin D Deficiency in Early Infancy. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 36, n. 4, p. 319-321, maio 2014.

HAJARIZADEH, B. et al. Epidemiology and Natural History of HCV Infection. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, n. 9, p. 553-62, set. 2013.

JESUS, R. P. et al. Regeneração Hepática: Papel dos Fatores de Crescimento e Nutrientes. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 242-54, 2000.

JHONS, J. L.; CHRISTOPHER, M. M. Extramedullary Hematopoiesis: A New Look at the Underlying Stem Cell Niche, Theories of Development, and Occurrence in Animals. **Vet. Pathol.**, v. 49, n. 3, p. 508-523, maio 2012.

JIANG, Z. G. et al. Aspirin Use is Associated With Lower Indices of Liver Fibrosis Among Adults in the United States. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 43, n. 6, p. 734-43, mar. 2016.

JOHANSSON, S. et al. Plasma Levels of Growth-related Oncogene (CXCL1-3) Associated With Fibrosis and Platelet Counts in HCV-infected Patients. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 42, n. 9, p. 1111-21, nov. 2015.

KAPLAN, M. M.; BONIS, P. A. L. Histologic scoring systems for chronic liver disease. **UpToDate**, jan. 2012.

KONG, L. et al. Structural Basis of Hepatitis C Virus Neutralization By Broadly Neutralizing Antibody HCV1. **PNAS**, v.5, n. 22, p. 1-6, abr. 2012.

KUPFER, B. HCV – Virology. In: MAUSS, S. et al. **Hepatology** - A Clinical Textbook. Frankfurt: Flying Publisher, p. 61-82, 2010.

KUSHNER, L. E. et al. Immune Biomarker Differences and Changes Comparing HCV Mono-infected, HIV/HCV Co-infected, and HCV Spontaneously Cleared Patients. **Plos One**. v. 8, p. 1-17, 2013.

LARRUBIA, J. R. et al. Role of Chemokines and Their Receptors in Viral Persistence and Liver Damage During Chronic Hepatitis C Virus Infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 7149-59, 2008.

LAWITZ, E. et al. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, n. 20, p. 1878-87, maio 2013.

LEE, M. M. et al. Platelets Support Extracellular Sialylation by Supplying the Sugar Donor Substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 13, p. 8742-8, mar. 2014.

LIANG T J et al. Pathogenesis Natural History, Treatment and Prevention of Hepatitis C. **Ann. Internal Med.**, 132, p. 296-305, 2000.

LYU, J. et al. Roles of lipoprotein receptors in the entry of hepatitis C vírus. **World J. Hepatol.**, v. 7, n. 24, p. 2535-42, out. 2015.

MAEDA, M. F. Y. et al. Vascularização na Cirrose Hepática: Estudo Imunoistoquímico Baseado em Necropsias. **Arq. Gastroenterol.**, v. 45, n. 1, p. 38-45, jan./ mar. 2008.

MAGNONI, M. S. **Perfil Imunofenotípico e Nível de Citocinas Plasmáticas em Portadores de Hepatite C Crônica com Diferentes Graus de Comprometimento Hepático.** 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

MARTINEZ-ESPARZA, M. et al. Inflammatory Status in Human Hepatic Cirrhosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 21, n. 41, p. 11522- 41, nov. 2015.

MENDT, M.; CARDIER, J. E. Role Of SDF-1 (CXCL12) In Regulating Hematopoietic Stem And Progenitor Cells Traffic Into The Liver During Extramedullary Hematopoiesis Induced By G-CSF, AMD3100 And PHZ. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 214-21, dez. 2015.

MUENCH, O. M. et al. The Adult Livers of Immunodeficient Mice Support Human Hematopoiesis: Evidence for a Hepatic Mast Cell Population that Develops Early in Human Ontogeny. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. 1-15, maio 2014.

MURATA, S. et al. Signal Transduction of Platelet-Induced Liver Regeneration and Decrease of Liver Fibrosis, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 4, p. 5412- 5425, mar. 2014.

NEUMAN, M. G. et. al. Markers of Inflammation and Fibrosis in Alcoholic Hepatitis and Viral Hepatitis C. **Int. J. Hepatol.**, 2012: p. 1-10.

OLIVEIRA, F. S. **A contribuição do Fator Transformador de Crescimento Beta – 1 TGF-B1 na fibrose hepática: Estudos in vivo e in vitro.** 2009. 57 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PADOVANI, J. L. et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 2, p. 154-155, abr. 2013.

POYNARD, T. et al. Natural :History of Liver Fibrosis Progression in Patients With Chronic hepatitis C. **Lancet**, v. 349, p. 825-832, 1997.

POZZETTO, B. et al. Health Care-associated Hepatitis C Virus Infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 46, p. 17265-78, dez. 2014.

PYBUS, O. G.; THÈZE, J. Hepacivirus Cross-Species Transmission and the Origins of the Hepatitis C vírus. **Curr. Opin. Virol.**, v. 2015, n. 16, p. 1-7, 2015.

ROSENSTINGL, S. et al. Mixed Myelodysplastic Syndrome and Myeloproliferative Disorder with Bone Marrow and Pulmonary Fibrosis: The Role of Megakaryocytes. **Acta Haematol.**, v. 109, n. 3, p. 145-9, abr. 2003.

ROSSI, L. M. et al. Advanced Molecular Surveillance of Hepatitis C Virus. **Viruses**, v. 7, n. 3, p. 1153-88, mar. 2015.

SAHA, B.; SZABO, G. Innate Immune Cell Networking in Hepatitis C Virus Infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 96, n. 6, p. 757-66, nov. 2014.

SEBATIANI, G. et al. Chronic Hepatitis C and Liver Fibrosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 32, p. 11033-53, ago. 2014.

SILVA, G. F. et al. Grading and Staging Chronic Hepatitis C and Its Relation to Genotypes and Epidemiological Factors in Brazilian Blood Donors. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 142-9, abr. 2005.

SILVA, G. F. et al. Human Platelet Antigen Genotype Is Associated With Progression of Fibrosis in Chronic Hepatitis C. **J. Med. Virol.**, v. 84, p. 56–60, 2012.

SKLAN, E. H. et al. Mechanisms of HCV survival in the host. **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 6: p. 217-27, 2009.

SMITH, D. B. et al. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318-27, jan. 2014.

SOARES, S. et al. Participação das Plaquetas no Processo de Fibrose dos Pacientes com Esquistossomose Mansônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 3, p. 321-5, maio/ jun. 2007.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 1, p. 69-82, jan./fev. 2001.

TANIKAWA, A. A. **Avaliação dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF na progressão da fibrose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo Vírus da Hepatite C.** 2015. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2015.

TAVIAN, M.; PÉAULT, B. The Changing Cellular Environments of Hematopoiesis in Human Development in Utero. **Exp. Hematol.**, v. 33, n. 9, p. 1062-9, set. 2005.

TOWELL, B. L.; LEVINE, S. P. Massive Hepatomegaly Following Splenectomy for Myeloid Metaplasia. **Am. J. Med.**, v. 82, p. 371-375, fev. 1987.

VARAKLIOTI, A. et al. Alternate Translation Occurs Within The Core Coding Region Of The Hepatitis C Viral Genome. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 20, p. 17713-17721, maio 2002.

VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A. Transforming Growth Factor- β and Fibrosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 22, p. 3056-62, jun. 2007.

VISO, A. T. R. Resposta Imune ao Vírus da Hepatite C e Características Genéticas Determinantes. **II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia da Hepatite C**, p. 43-7, 2004.

WALD, O. et al. Chemokines in Hepatitis C Virus Infection: Pathogenesis Prognosis and Therapeutics. **Cytokine**, v. 39, n. 1, p. 50-62, jul. 2007.

WANDERLEY, F. G. C. et al. Miofibroblastos Células Relevantes na Saúde e na Doença. **Rev. Bahiana Odontol.**, v. 5, n. 2, p. 117-24, ago. 2014.

WANG, C. et al. Strong Association of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and Thrombocytopenia: Implications From a Survey of a Community With Hyperendemic HCV Infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 6, p. 790-6, set. 2004.

WASMUTH, H. E. et al. Chemokines in Liver Inflammation and Fibrosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 30, p 215-225, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media Centre**, Hepatitis C.. Jul. 2015. Disponível em: < <https://translate.google.com.br/?hl=pt-BR&tab=wT> >. Acesso em: 9 nov. 2015.

XU, Z. et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. **EMBO J.**, v. 20, n. 14, p. 3840-48, jul. 2001.

ZANICHELLI, M. A. et al. Hematopoese, Fatores de Crescimento e Aplicação Clínica da Eritropoetina na Anemia da Prematuridade. **Pediatria**, v. 17, n. 3, p. 136-42, maio 1995.

ZEREMSKI, M. et al. The Role of Chemokines as Inflammatory Mediators in Chronic Hepatitis C Virus Infection. **J. Viral. Hepat.**, v. 14, p.675-87, 2007.

ZIMERMAN, J. et al. Metaplasia Megacariocítica Hepática em Paciente com Trombocitemia Essencial. **Hematologia**, v. 12, n. 1, p. 18, abr. 2008.

ZORZETTO, R. O Mapa das Hepatites. **Pesq. Fapesp**, n. 187, p. 16-21, set. 2011.

6 Apêndices

6.1 Apêndice A – Ficha Clínica



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Hemocentro de Botucatu - HC – FMB
LABORATÓRIO DE CITOMETRIA DE FLUXO
DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU – SP - CEP: 18.618-000 - ☎/FAX (14) 3811-6041
e-mail: citometria@fmb.unesp.br

FICHA CLÍNICA

PROJETO: HEPATITE C - METAPLASIA MIELÓIDE NA GÊNESE DA FIBROSE HEPÁTICA

Nome: _____

RG: _____ Data Nascimento: _____ Sexo: () Masculino () Feminino

Grau de Fibrose: _____ Genótipo: _____ Data da biópsia hepática: _____

Data do diagnóstico sorológico: _____ Data do contágio: _____

Data que iniciará tratamento: _____

Causas (prováveis) da infecção:

- () Cirurgia
- () Tratamento Dentário
- () Transusão
- () Promiscuidade
- () Uso de drogas
- () Tatuagem
- () Contato Familiar com HCV
- () Profissional da Saúde
- () Outra: Especificar: _____

Quanto ao uso de álcool:

CAGE Questionnaire (Cut down / Annoyed / Guilty / Eye-opener)*		
<i>O consumo de álcool é considerado de risco a partir de 2 respostas afirmativas.</i>		
1. Alguma vez o (a) Sr. (a) sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber?	()	()
2. As pessoas o (a) aborrecem porque criticam o seu modo de beber?	()	()
3. O (A) Sr. (a) se sente culpado (a) (chateado consigo mesmo) pela maneira como costuma beber?	()	()
4. O (A) Sr. (a) costuma beber pela manhã para diminuir o nervosismo ou a ressaca?	()	()

Crítérios de Exclusão: Co-infecções com HIV, HBV, HTLV, uso de álcool frequente (mais de 2 respostas afirmativas no teste CAGE).

*Marques ACPR, 2002, Ribeiro M, *et al.* Projeto Diretrizes: Abuso e Dependência do Álcool. Associação Bras. Psiquiatria. 2002. p. 1

6.2 Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIVISÃO **HEMOCENTRO – BOTUCATU**
DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU - SP - CEP: 18.618-000 - ☎(14) 3811-6041
e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo de Estudo – Pacientes Hepatite C)

Eu, _____,

RG nº _____, telefone: _____, residente à

estou sendo convidado pelo pesquisador Prof. Paulo Eduardo de Abreu Machado, RG 2985904, a participar da pesquisa “HEPATITE C – METAPLASIA MIELÓIDE NA GÊNESE DA FIBROSE HEPÁTICA”, na qual farei parte do grupo de pacientes que serão avaliados através de exames de laboratório que podem auxiliar no acompanhamento desta doença. Aceitando participar, estou ciente que doarei três amostras de sangue (5mL) para a realização dos exames, antes de iniciar meu tratamento e uma parte do material que já será colhido na biópsia, será usada neste estudo. O exame verificará células sanguíneas. Não haverá nenhuma nova intervenção exclusiva para a pesquisa. Os riscos esperados são aqueles que podem ou não acontecer após a coleta de sangue, como o aparecimento de mancha roxa no braço. O material (sangue) será utilizado exclusivamente nesta pesquisa, sendo imediatamente descartado após o uso. Os dados obtidos serão mantidos em sigilo, não sendo exposta a identificação do paciente em qualquer momento.

Assim considero-me esclarecido(a) e concordo em colaborar. Afirmando não ter sido pressionado(a) física ou psicologicamente para colaborar com a pesquisa ou assinar o presente termo, estando ciente que os responsáveis por este trabalho no Hemocentro (dados dos pesquisadores abaixo) estarão disponíveis para responder

Pesquisador:	Paulo Eduardo de Abreu Machado
Endereço:	Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
Fones / e-mail:	(014) 3811-6041 hemocentro@fmb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIVISÃO **HEMOCENTRO – BOTUCATU**
DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU - SP - CEP: 18.618-000 - ☎(14) 3811-6041
e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

a quaisquer perguntas ou dúvidas. O não consentimento da minha parte não interferirá na qualidade do atendimento de minha saúde. Este documento será assinado em duas vias, sendo uma para do paciente e outra arquivada pelo pesquisador.

"Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143."

Botucatu, _____ de _____ de _____.

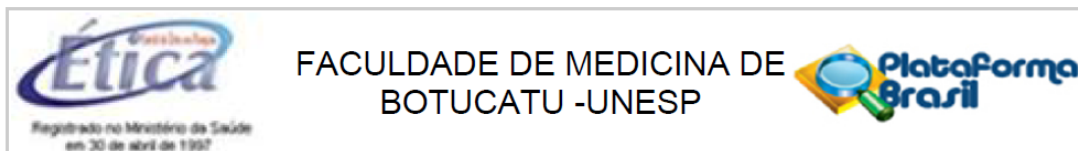
Doador

Paulo Eduardo de Abreu Machado
Pesquisador

Pesquisador:	Paulo Eduardo de Abreu Machado
Endereço:	Hemocentro de Botucatu – Distrito Rubião Júnior, s/nº Campus UNESP
Fones / e-mail:	(014) 3811-6041 hemocentro@fmb.unesp.br

7 Anexos

7.1 Anexo A – Parecer de Aprovação pelo CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Hepatite C - metaplasia mielóide na gênese da fibrose hepática.

Pesquisador: Paulo Eduardo de Abreu Machado

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 14158713.5.0000.5411

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.354.285

Apresentação do Projeto:

Tratam os autos de Emenda enviada pelos pesquisadores, no sentido de dividir em 03 sub-Projetos o Projeto Maior na seguinte conformidade:

Projeto maior: (Protocolo CAAE 14158713.5.0000.5411) Hepatice C-metaplasia mielóide na gênese da fibrose hepática, coordenado pelo Prof. Titular Paulo Eduardo de Abreu Machado, aprovado por este colegiado em 01/04/2013.

Sub-Projeto I: Detecção in vitro do vírus da hepatite C (VHC) em megacariócitos provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus, a ser conduzido por Nathália Almeida Souza, orientada pela Profª Dra. Rejane Maria Tomasini Grotto, Coorientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado. (Mestrado)

Sub-Projeto II: Interação entre citocinas, plaquetas e fibrogenese na investigação da metaplasia mieloide hepática, a ser conduzido por Aline Márcia Marques Braz Rosso, orientada pela Profª Dr.ª Márjorie de Assis Golim e Co-orientada: pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado (Mestrado);

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 1.354.285

Sub-Projeto III: Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C, que será conduzido por Caroline Mitiká Watanabe, orientada por Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado e Co-Orientada pela Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim (Mestrado).

Objetivo da Pesquisa:

Constante do Parecer nº 820.536 (Projeto maior)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constante do Parecer nº 820.536 (Projeto Maior)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A subdivisão em 3 Subprojetos não alterou o delineamento inicial proposto. O propósito da divisão foi no sentido de explanar cada fase do estudo com o propósito de Dissertação a ser defendida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE não foi alterado, uma vez que trata-se do mesmo aplicado no projeto maior.

Recomendações:

Sugerimos Relatório Final de Atividades em separado para cada subprojeto defendido.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação da Emenda na seguinte conformidade: Divisão do Projeto maior em 3 subprojetos acima especificado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP em reunião de 07/12/2015 APROVOU a divisão de Projeto Maior em 3 Sub-Projetos à saber:

Sub-Projeto I: Detecção in vitro do vírus da hepatite C (VHC) em megacariócitos provenientes de indivíduos não infectados expostos ao vírus, a ser conduzido por Nathália Almeida Souza, orientada pela Profª Dra. Rejane Maria Tomasini Grotto, Coorientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado. (Mestrado)

Sub-Projeto II: Interação entre citocinas, plaquetas e fibrogenese na investigação da metaplasia mioide hepática, a ser conduzido por Aline Márcia Marques Braz Rosso, orientada pela Profª Dr.ª Márjorie de Assis Golim e Co-orientada: pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.354.285

(Mestrado);

Sub-Projeto III: Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e a influência na fisiopatologia da hepatite C, que será conduzido por Caroline Mitiká Watanabe, orientada por Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado e Co-Orientada pela Profa. Dra. Marjorie de Assis Golim (Mestrado).

O CEP aguarda envio de Relatório Final de Atividades em separado para cada subprojeto defendido, que deverá ser postado na Plataforma Brasil através de "NOTIFICAÇÃO".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_623487E2.pdf	13/11/2015 16:17:26		Aceito
Outros	Subprojeto_3_Caroline_Mitika.pdf	13/11/2015 16:10:06	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	Subprojeto_2_Aline_Braz.pdf	13/11/2015 16:08:02	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	Subprojeto_1_Nathalia_Almeida.pdf	13/11/2015 16:06:16	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	of_392.jpg	13/11/2015 15:57:38	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	of_391.jpg	13/11/2015 15:57:10	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - Emenda.pdf	15/09/2014 17:10:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO FINAL - metaplasia - Emenda.pdf	15/09/2014 16:39:02		Aceito
Outros	Ofício ao CEP - alteração metodologia.pdf	15/09/2014 12:07:03		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorização Jáú - Dr Vergilio.pdf	15/09/2014 11:47:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE -MO- DOADORES.pdf	15/09/2014 10:53:04		Aceito
Outros	CEP_DOCUMENTO_Dr Giovanni.jpg	11/03/2013 10:42:16		Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.354.285

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - doadores.doc	11/03/2013 09:37:53		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - pacientes Hepatite.doc	11/03/2013 09:37:39		Aceito
Outros	DECLARA_PEAM (2).jpg	07/03/2013 12:14:37		Aceito
Outros	TERMO_COMPROMISSO_PEAM (2).jpg	07/03/2013 12:14:21		Aceito
Outros	dr. josé.pdf	07/03/2013 10:46:56		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	dra. maria.pdf	07/03/2013 10:46:19		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 07 de Dezembro de 2015

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br