UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

SÉRGIO SOUZA FIGUEIREDO

Inter-relações entre o Antígeno Leucocitário Humano-G, o Pseudorreceptor Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso e Ativina Ligado à Membrana, e os Processos Inflamatórios/fibrogênicos Hepáticos na Hepatite Autoimune

Ribeirão Preto
2017

SÉRGIO SOUZA FIGUEIREDO

Inter-relações entre o Antígeno Leucocitário Humano-G, o Pseudorreceptor Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso e Ativina Ligado à Membrana, e os Processos inflamatórios/fibrogênicos Hepáticos na Hepatite Autoimune

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP/USP

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

Área de Concentração: Medicina

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho

Ribeirão Preto
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Figueiredo, Sérgio Souza

Inter-relações entre o antígeno leucocitário humano-G, o pseudorreceptor inibidor de proteína morfogênica de osso e ativina ligado à membrana, e os processos inflamatórios/fibrogênicos hepáticos na hepatite autoimune. Ribeirão Preto, 2017.

52 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Naira Zambelli Ramalho, Leandra.

1. Hepatite Autoimune. 2. Hemocromatose Hereditária. 3. Hemossiderose. 4. ALH-G. 5. BAMBI. 6. Fibrose Hepática.

Figueiredo SS. Inter-relações entre o Antígeno Leucocitário Humano-G, o pseudorreceptor Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso e Ativina Ligado à Membrana, e os Processos inflamatórios/fibrogênicos Hepáticos na Hepatite Autoimune [doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Julgamento: _____

À toda minha família e amigos, pelo suporte, encorajamento e amor demonstrado por toda minha vida.

À minha namorada e parceira Karime, pela compreensão, carinho e amor.

Às minhas filhas de patas, Sophie e Mel, simplesmente por existirem em minha vida e pela felicidade que me proporcionam.

Em especial ao meu pai, Dr. Marco Antônio de Castro Figueiredo, recém aposentado e com a certeza de ter deixado um enorme legado na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho, pela oportunidade, paciência, dedicação e sabedoria na orientação desse trabalho.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Às técnicas Marlei Josieli Augusto e Deisy Mara Silva, pela amizade e colaboração na aplicação das metodologias.

A todos os meus colegas de laboratório, Lívia Maria Della porta Cosac, Leticia de Araujo Apolinário, Maraiza Silva Gomes, Marcos Roberto Tovani Palone, Maurício de Rosa Trotta, Natália Alle Parreira e Renan Augusto Pereira pelo convívio, amizade, e colaboração em todo o período do doutorado.

RESUMO

Figueiredo SS. Inter-relações entre o Antígeno Leucocitário Humano-G, o Pseudorreceptor Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso e Ativina Ligado à Membrana, e os Processos inflamatórios/fibrogênicos Hepáticos na Hepatite Autoimune [doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

A Hepatite Autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica oriunda de autoimunidade, ocasionando fibrose hepática. O objetivo desse estudo foi verificar possíveis inter-relações entre HLA-G, BAMBI e processos inflamatórios/fibrogênicos hepáticos na Hepatite Autoimune, tanto em biópsias de pacientes pré quanto pós-tratamento com imunossupressores. Foram selecionadas noventa e cinco biópsias de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto diagnosticados com HAI, associados ou não a depósitos de ferro no fígado. As biópsias foram submetidas à imuno-histoquímica para marcação das proteínas HLA-G e BAMBI. As estatísticas foram determinadas pelos testes Mann-Whitney e correlação de Spearman. A expressão de HLA-G e de BAMBI se apresentou aumentados conforme o agravamento da inflamação e fibrose em pacientes pré-tratamento com boa ou má resposta ao tratamento. No entanto, a expressão de HLA-G e de BAMBI foi reduzida nas biópsias pós-tratamento apenas nos pacientes bom respondedores (diminuição da fibrose). Não houve quaisquer relações entre as quantificações de HLA-G e BAMBI com o número de plasmócitos ou com depósitos de ferro no fígado tanto em pacientes pré quanto pós-tratamento. Os resultados sugerem que tanto HLA-G quanto BAMBI são imunorreguladores sensíveis à intensidade do processo inflamatório no fígado, tendo suas expressões aumentadas ou diminuídas de acordo com a demanda por substâncias que regulem compostos e células imunológicas na HAI. Sugerem também que o infiltrado plasmocitário não é regulado diretamente pelo HLA-G ou BAMBI, e que os depósitos de ferro no fígado não são capazes de influenciar nem o grau inflamatório, nem as expressões de HLA-G e BAMBI.

Palavras-chave: Hepatite Autoimune (HAI). Hemossiderose. Fibrose Hepática. HLA-G. BAMBI.

SUMMARY

Figueiredo SS. Interrelations between G-Human Leukocyte Antigen, Pseudoreceptor Morphogenic Bone Protein Inhibitor and Membrane-Linked Activin, and Hepatic Inflammatory / Fibrogenic Processes in Autoimmune Hepatitis [PhD]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 2017.

Autoimmune Hepatitis (HA) is a chronic inflammatory disease originating from autoimmunity, causing liver fibrosis. The objective of this study was to verify possible interrelations between HLA-G, BAMBI and inflammatory / fibrogenic hepatic processes in Autoimmune Hepatitis, both in pre and post-treatment immunosuppressive biopsies. Ninety-five biopsies of patients from the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto diagnosed with HA, associated or not with iron deposits in the liver, were selected. Biopsies were submitted to immunohistochemistry for the labeling of HLA-G and BAMBI proteins. The statistics were determined by the Mann-Whitney tests and Spearman's correlation. The expression of HLA-G and BAMBI was increased as worsening of inflammation and fibrosis in pre-treatment patients with good or poor response to treatment. However, the expression of HLA-G and BAMBI was reduced in post-treatment biopsies only in patients with good responders (decreased fibrosis). There were no relationships between the quantifications of HLA-G and BAMBI with the number of plasma cells or with liver iron deposits in both pre and post-treatment patients. The results suggest that both HLA-G and BAMBI are immunoregulators sensitive to the intensity of the inflammatory process in the liver, their expressions being increased or decreased according to the demand for substances that regulate immune cells and compounds in HA. They also suggest that plasmacytic infiltrate is not directly regulated by HLA-G or BAMBI, and that the liver iron deposits are not capable of influencing either the inflammatory grade or the expressions of HLA-G and BAMBI.

Key words: Autoimmune hepatitis (HA). Hemosiderosis. Hepatic fibrosis. HLA-G. BAMBI.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAASH	Anticorpo Antiantígeno Solúvel Hepático
AAC	Anticorpo Anticromatina
AACF	Anticorpo Anticitosol de Fígado
AAMFR	Anticorpo Antimicrosomo de Fígado e Rim
AAML	Anticorpo Antimúsculo Liso
AAN	Anticorpo Antinuclear
AANCP	Anticorpo Antineutrófilo Citoplasmático Perinuclear
AARA	Anticorpo Antireceptor de Asialoligoproteína
BAMBI	Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso e Ativina Ligado à Membrana
CAA	Células Apresentadoras de Antígenos
CCL	Quimiocina Ligante C-C
CEHa	Células Estreladas Hepáticas Ativadas
CEHq	Células Estreladas Hepáticas Quiescentes
CK	Células de Kupffer
CPH	Células Progenitoras Hepáticas
CPHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GIHAI	Grupo Internacional de Hepatite Autoimune
HAI	Hepatite Autoimune
HFE	Gene da Hemocromatose Humana
HH	Hemocromatose Hereditária
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano-G
HPH	Hepatócitos Primários Humanos
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina

ILT	Receptores Transcritos Semelhantes à Imunoglobulina
KIR2DL4	Receptores Semelhantes à Imunoglobulina Killer Cell
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TfR	Receptor de transferrina
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta
TGF- β R	Receptor de Fator de Crescimento Transformador beta
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TLR	Receptores semelhantes a Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulador

SUMÁRIO

1	Introdução	13
1.1	Hepatite Autoimune	13
1.1.1	Etiopatogenia da HAI	14
1.1.2	Fatores ambientais na HAI	14
1.1.3	Imunopatogenia e mecanismos de agressão hepática da HAI	14
1.2	Antígeno Leucocitário Humano - G (HLA-G) e HAI	15
1.3	Hemocromatose Hereditária	19
1.3.1	Mecanismos Patológicos da HH	20
1.4	Inflamação/Fibrose Hepática	21
1.4.1	Ativação de CEHq, TGF-β1, e o Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso (BMP) e Ativina Ligado à Membrana (BAMBI)	21
2	Objetivo	24
3	Materiais e Métodos	26
3.1	Casuística	26
3.2	Imuno-Histoquímica	27
3.3	Pesquisa de genes HFE	27
3.4	Estatística	28
4	Resultados	30
4.1	Relações entre expressões de HLA-G, BAMBI em hepatócitos e Graus de fibrose em biópsias de pacientes pré tratamento	30
4.2	Relações entre expressões de HLA-G, BAMBI e Graus de inflamação em biópsias de pacientes pré tratamento	32
4.3	Relações entre expressões de HLA-G e BAMBI em hepatócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI	33
4.4	Relações entre contagem de Plasmócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI, e expressões de HLA-G e BAMBI	34

4.5	Relação entre as mutações no gene HFE, HLA-G e BAMBI na HH.....	35
5	Discussão	37
5.1	Relações entre expressões de HLA-G em hepatócitos, graus de fibrose e inflamação na HAI	37
5.2	Relações entre expressões de BAMBI em hepatócitos, graus de fibrose e inflamação na HAI	38
5.3	Relações entre expressões de HLA-G e BAMBI em hepatócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI	41
5.4	Relações entre contagem de Plasmócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI, e expressões de HLA-G e BAMBI	42
5.5	Relação entre as mutações no gene HFE, HLA-G e BAMBI na HH	44
6	Conclusão	46
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	52

1 Introdução

1.1 Hepatite Autoimune

A Hepatite Autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado, como as hepatites virais, medicamentosas e idiopáticas, se caracterizando pela agressão autoimune aos hepatócitos (1), presença de autoanticorpos circulantes, hipergamaglobulinemia, mudanças necroinflamatórias na histologia hepática e uma resposta significativa à terapia imunossupressora (2).

Possui quadros clínicos variados, podendo ter início “silencioso” ou exuberante, semelhante a uma hepatite aguda. Alguns pacientes podem ser assintomáticos, no entanto a maioria relata letargia, fadiga e mal-estar. Exames físicos podem ainda apresentar hepatoesplenomegalia, ascite, icterícia, edema periférico, e muitos pacientes chegam a apresentar cirrose hepática na época do diagnóstico (3, 4).

A classificação da HAI em 2 tipos é baseada no perfil de autoanticorpo sérico. A HAI do tipo I é caracterizada pela presença de Anticorpo Antinuclear (AAN), Anticorpo Antimúsculo Liso (AAML), ou ambos e constituem cerca de 80% dos casos de HAI. O tipo II se caracteriza pela presença de Anticorpos Antimicrosomo de Fígado e Rim I (AAMFR-I), e/ou III (AAMFR-III), e/ou Anticorpo Anticitosol de Fígado I (AACF-I) (2, 5, 6, 7). Outros anticorpos podem ser avaliados em pacientes que são negativos para os convencionais relacionados à HAI, como por exemplo, anticorpos Antineutrófilo Citoplasmático Perinuclear (AANCP), Antiactina, Antiantígeno Solúvel Hepático (AAASH), Antireceptor de Asialoligoproteína (AARA), Anticromatina (AAC) e Anticitosol de Fígado I (AACF-I) (6).

Epidemiologicamente, a prevalência da HAI ainda é desconhecida devido à pouca disponibilidade de estudos epidemiológicos descritivos e que, em sua maioria, não contaram com critérios padrões de inclusão para diagnóstico de HAI, visto que foram realizados antes da introdução do sistema de escore estabelecido pelo Grupo Internacional de Hepatite Autoimune (GIHAI). Além disso, estudos anteriores não excluíram pacientes como hepatite C crônica (8). Entretanto, um estudo mais recente de 2013, após a inserção dos critérios de inclusão, aponta que 3/4 de crianças e adolescentes diagnosticados com HAI são do sexo feminino. Ainda, na infância a HAI tipo I contabiliza 2/3 dos casos e se apresentam em torno do período de puberdade; enquanto que a HAI tipo II tende a se apresentar mais precocemente (9).

1.1.1 Etiopatogenia da HAI

Ainda que as causas exatas da HAI não sejam totalmente conhecidas, admite-se que sejam desencadeadas por fatores ambientais e falha nos mecanismos de tolerância imunológica em pacientes geneticamente propensos. Os fatores desencadeadores podem ser de origem viral ou por uso de fármacos, mas na maioria dos casos a origem é desconhecida (2, 3).

Esses fatores podem compartilhar epítomos que se assemelham a autoantígenos, e mimetismo molecular entre antígenos estranhos e autoantígenos é o mecanismo de iniciação mais frequentemente proposto na HAI tipo II, onde o autoantígeno é conhecido. Exposições repetidas ao antígeno desencadeador, por sua vez, podem provocar respostas autorreativas órgão-específicas (2, 3).

1.1.2 Fatores ambientais na HAI

Diversas drogas também têm sido implicadas como desencadeadores da HAI, como Infliximabe (10), Minociclina (11), Atorvastatina (12), Diclofenaco, Isoniazida, α -metildopa, Nitrofurantoína, Propiltiouracil e vacina para hepatite A (13). É proposto também que alguns ativos oriundos de ervas podem induzir a HAI (14).

A razão exata pela qual essas drogas podem induzir HAI ainda é desconhecida, mas pode ser devido a seus efeitos hepatotóxicos, *upregulation* de proteínas (P450 e proteínas imunorreguladoras), ou então devido a suas atividades como haptenos por modificarem as proteínas hepáticas, deixando-as imunogênicas (2).

Outro suposto fator desencadeador da HAI pode ser a pré-exposição aos vírus das hepatites A, B, C, e do Sarampo. Os anticorpos AAN e AAML também podem ocorrer em diversas outras causas de hepatites agudas e crônicas, como a alcoólica, esteato-hepatite não alcoólica e virais (2).

1.1.3 Imunopatogenia e mecanismos de agressão hepática da HAI

Uma visão completa da patogênese da HAI permanece indefinida e tem sido intensamente investigada nas últimas três décadas (2, 15). O quadro histológico de hepatite de interface, que caracteriza a doença, com seu denso infiltrado de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos foi o primeiro a sugerir que um ataque celular autoimune é base da HAI. Sejam quais forem os fatores desencadeadores, esse recrutamento massivo de células inflamatórias ativadas causará destruição de hepatócitos. Estudos imuno-histoquímicos nas regiões de hepatite de interface

identificaram uma predominância de linfócitos T expressando os receptores α/β de células-T. Dentre elas, a maioria é positiva para o fenótipo CD4 *helper*/indutor, e uma minoria considerável para linfócitos CD8 citotóxicos. Linfócitos de uma linhagem celular não-T são raros e incluem células *natural killers* (NK), macrófagos, células B e plasmócitos (15). Além das células supracitadas, outros componentes do sistema imunológico encontrados são as citocinas (2,16).

Independentemente de sua etiologia, os mecanismos patológicos que levam à agressão hepática são complexos e envolvem tanto o sistema imunológico inato quanto o adaptativo (15). Hepatócitos isolados de pacientes com HAI são revestidos com imunoglobulinas e suscetíveis a citotoxicidade celular anticorpo-dependente quando expostos à células mononucleares autólogas com receptores Fc (fragmento cristalizável) (2, 16). Estudos anteriores demonstraram a presença de células citotóxicas nos compartimentos de células T e não-T de sangue periférico de pacientes com HAI. Essa atividade citotóxica é maior em pacientes com a doença ativa, mas é vista somente em 40% dos pacientes em remissão (17). Pacientes com HAI possuem frequência 10 vezes maior de células T hepatoespecíficas se comparados com pessoas saudáveis (18). Nessas pessoas, também se encontra um tipo celular, chamada célula T reguladora (Tregs), que, como o próprio nome sugere, regulam ou limitam respostas imunes (ação imunorreguladora), prevenindo a proliferação e função efetora de células T autorreativas. Em pacientes com HAI, foi demonstrada diminuição no número e função dessas células Tregs (2, 19, 20).

1.2 Antígeno Leucocitário Humano - G (HLA-G) e HAI

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPHC) é um complexo de genes com múltiplos *loci*, cujas moléculas apresentam antígenos às células do sistema imune (21). Nos humanos, esse conjunto de genes é chamado de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), que se localizam no cromossomo 6, herdados em bloco e expressos em codominância (21, 22).

Os *loci* gênicos do HLA são agrupados em 3 classes, de acordo com sua estrutura, função e localização. Os genes HLA de classe I, são altamente polimórficos e responsáveis pela codificação das moléculas de histocompatibilidade clássicas, também chamadas de classe 1a, como HLA-A, HLA-B, HLA-C, as quais são altamente polimórficas e com grande número de alelos codificando alta quantidade de proteínas funcionais; e não clássicas, também chamadas de classe 1b, como HLA-E, HLA-F,

HLA-G, as quais possuem baixíssimo polimorfismo e pequeno número de alelos codificando baixa quantidade de proteínas (21, 22).

Os genes HLA de classe II codificam moléculas expressas em células apresentadoras de antígenos (CAA) como linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e alguns tipos de linfócitos T. Os alelos HLA de classe III codificam proteínas importantes para o aparelho imune, como fator de necrose tumoral e componentes do sistema complemento (21).

Alguns estudos demonstram mecanismos patogênicos do HLA de classes I e II na HAI. Provavelmente a agressão hepática é orquestrada por linfócitos CD4 positivos que reconhecem um peptídeo autoantigênico. A resposta autoimune se inicia após esse peptídeo ser “abraçado” por um HLA de classe II e apresentado a uma célula auxiliar T CD4 positiva inativa (Th0) por uma CAA, na presença de sinais coestimuladores apropriados, induzidos pela interação dos receptores CD28 da Th0 e CD80 da CAA. Depois de ativado, dependendo do tipo de antígeno apresentado e das citocinas presentes no microambiente, as Th0 podem se diferenciar em 3 tipos de células efetoras: Th1, Th2 e Th17. Estas células iniciam uma cascata de reações imunes amplamente determinadas pelas citocinas que cada uma produz (15, 20):

- Células Th1 secretam principalmente Interleucina-2 (IL-2) e Interferon Gama (IFN- γ), que é considerado o principal mediador de danos teciduais, uma vez que não só estimula as células CD8 e aumenta a expressão de moléculas de HLA de classes I e II nos hepatócitos, como também ativa monócitos/macrófagos, os quais liberam IL-1 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (citocinas inflamatórias e fibrogênicas) (15);

- Células Th2 produzem IL-4, IL-10 e IL-13, citocinas que induzem a maturação de células B em plasmócitos, com subsequente produção de autoanticorpos(15);

- Células Th17, que surgem na presença de Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF- β) e IL-6, produzem IL-17, IL-22, TNF- α e expressam a Quimiocina Ligante C-C 20 (CCL20), que possui forte quimiotaxia por linfócitos. Recentemente, estudos demonstraram que as Th17 estão envolvidas em doenças autoimunes humanas. Elas têm sido implicadas na patogênese de outra doença hepática autoimune, a cirrose biliar primária. Embora a sua contribuição para danos hepáticos em HAI ainda esteja sob investigação, um artigo recente mostrou um aumento do número de Th17, tanto no sangue periférico como no fígado de pacientes

Vários estudos nos últimos anos têm demonstrado que o HLA-G desempenha um papel importante imunorregulador no controle de doenças autoimunes e inflamatórias, tais como esclerose múltipla, doença de Cröhn, psoríase, pênfigo, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico, asma, artrite idiopática juvenil e artrite reumatoide (23).

Além da atividade nas doenças citadas acima e de vários genes que conferem suscetibilidade, influenciam em manifestações clínicas e na resposta ao tratamento serem localizados na região do HLA (8), a possível relação com a HAI se torna plausível quando entendemos alguns mecanismos de ação do HLA-G em alvos celulares específicos que atuam na patogenia da doença.

Resumidamente, o HLA-G pode interagir com Receptores Transcritos Semelhantes à Imunoglobulina 2 (ILT2), que são expressos por linfócitos T e B, NKs, monócitos/macrófagos e células dendríticas; com receptores ILT4, expressos somente pelas células mieloides (neutrófilos, monócitos/macrófagos e células dendríticas); com Receptores Semelhantes à Imunoglobulina Killer Cell (KIR2DL4), expressos por NKs; e receptores CD160, expressos por linfócitos T, NKs e células endoteliais (CE) (22, 23, 24).

Após sua ligação nesses receptores, o HLA-G pode afetar diversas funções dessas populações celulares: 1) Linfócitos T: Inibição de sua citotoxicidade e proliferação, diminuição da expressão de receptores de quimiocinas em sua superfície (inibição de quimiotaxia), e indução de sua apoptose e expansão de células Tregs; 2) Linfócitos B: Inibe sua diferenciação, proliferação e produção de citocinas, e diminuição da expressão de receptores de quimiocinas em sua superfície (inibição de quimiotaxia); 3) NKs: Inibição de sua proliferação e citotoxicidade, diminuição da expressão de receptores de quimiocinas em sua superfície (inibição de quimiotaxia), e indução da proliferação e liberação de fatores proangiogênicos no sangue; 4) Neutrófilos: inibe a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Tabela 1) (22, 23, 24).

Tabela 1 - Relação entre os diversos tipos celulares e suas respectivas funções afetadas pelo ALH-G.

Tipos Celulares	Funções Afetadas
Linfócitos T	↓ citotoxicidade, proliferação e quimiotaxia; ↑ apoptose e Tregs
Linfócitos B	↓ diferenciação, citotoxicidade, proliferação e quimiotaxia
NKs	↓ citotoxicidade, proliferação e quimiotaxia; ↑ fatores pró-angiogênicos
Neutrófilos	↓ fagocitose e produção de EROs

Diante do exposto até aqui, percebe-se que em diversas doenças de natureza autoimunes/inflamatórias, as moléculas de HLA, em particular as de HLA-G, possuem uma importante função imunossupressora/moduladora (21, 22, 23, 24).

Esta observação nos leva à uma dúvida pertinente: Teria, então, o HLA-G alguma relação com a HAI, uma doença também de natureza autoimune?

1.3 Hemocromatose Hereditária

A Hemocromatose Hereditária (HH) é um distúrbio autossômico recessivo do metabolismo do ferro, caracterizada pelo aumento na absorção desse íon, levando à sua deposição e agressão em diferentes órgãos, como o Fígado (25, 26). Devido sua natureza hereditária, a HH pode apresentar diferentes valores de prevalência dentre as variadas populações no mundo.

HH é mais frequentemente causada por duas mutações no gene HFE: a c.C187G do éxon 2, que resulta na substituição de histidina por ácido aspártico no aminoácido 63 (H63D) e a mutação c.G845A do éxon 4, que resulta na substituição de cisteína por tirosina no aminoácido 282 (C282Y) (25, 26). A homozigose C282Y (C282Y/C282Y) é encontrada na grande maioria dos casos de HH. Já a heterozigose C282Y/H63D e a homozigose H63D/H63D raramente causam sobrecarga sintomática de ferro. A distribuição de C282Y é semelhante à de HH, mas podem ser encontradas frequências elevadas de H63D entre as populações demonstrando baixa prevalência de HH. Esses dados tornam a mutação C282Y patologicamente mais relevante (26, 27, 28).

1.3.1 Mecanismos Patológicos da HH

O hormônio ferro-regulado hepcidina exerce um papel central na patogênese da HH. É produzido principalmente nos hepatócitos e secretado na corrente sanguínea. Ele se liga e degrada seu receptor alvo, o exportador de ferro ferroportina, para inibir a liberação de ferro de enterócitos do duodeno, macrófagos recicladores de ferro e hepatócitos. Qualquer defeito que, em última análise, prejudique a função do hormônio hepcidina e sua capacidade de monitorar e regular os níveis séricos de ferro, pode provocar um fenótipo de sobrecarga de ferro. Em pacientes com HH, os níveis de hepcidina são reduzidos, causando excesso de exportação de ferro mediada por ferroportina e, como consequência, aumento da absorção de ferro na dieta e liberação de ferro por macrófagos (26).

Subsequentemente, níveis elevados de ferro sérico conduzem a uma saturação da capacidade de ligação da transferrina, a proteína responsável pelo transporte do ferro pelo sangue. Assim, espécies de ferro não ligados à transferrina, especialmente a ferro plasmático lábil, serão “absorvidos” e retirados da corrente sanguínea por células parenquimatosas, como as do fígado, levando ao fenótipo de HH (26). Portanto, qualquer mutação nos genes que regulam a expressão do hormônio hepcidina, como é o caso do gene HFE, principalmente através da mutação C282Y, pode causar a HH (26, 27).

O gene HFE, como dito anteriormente, pertence ao CPH e codifica a proteína Hfe, localizada na membrana celular. A mutação C282Y prejudica a capacidade da Hfe se ligar à β -2 microglobulina e, como consequência, a impede de alcançar a membrana celular e se agrega intracelularmente. Isso causa uma sinalização prejudicada, levando à diminuição na expressão do mRNA e de níveis plasmáticos da hepcidina, e acúmulo excessivo de ferro sistêmico (29, 30).

O mecanismo molecular pelo qual a Hfe regula a expressão da hepcidina ainda não é totalmente compreendido. Foi proposto que a Hfe desempenha um papel regulador na detecção de concentrações séricas de ferro ligado à transferrina (TF-Fe), envolvendo interações proteína-proteína entre Hfe, Receptor de transferrina 1 (TfR1) e o Receptor de transferrina 2 (TfR2), este último específico do fígado. Altas concentrações de TF-Fe dissociam a Hfe do TfR1, que reforçam a interação entre a Hfe e o TfR2 (26).

O gene HFE, mutado na HH, está intimamente ligado às condições autoimunes, pois se localiza no braço curto do cromossomo 6, o mesmo *locus* do HLA, e, portanto, também faz parte do CPH. Desequilíbrio de *linkage* tem sido demonstrado especificamente entre as mutações no HFE e os alelos HLA-A e B (25, 28). De fato, diversos estudos demonstram condições autoimunes em pessoas com HH (28).

Independentemente da mutação, o acúmulo de ferro observado na HH é promotor de inflamação e fibrose hepáticas (30). Todavia, a influência dos depósitos de ferro sobre a progressão da fibrose e inflamação hepática em pacientes com HAI ainda não está completamente esclarecida. E ainda, o aumento nos depósitos de ferro também estaria influenciando a expressão do HLA-G na HAI?

1.4 Inflamação/Fibrose Hepática

Doenças hepáticas crônicas, como a HAI e a HH, se caracterizam por agressões constantes por longos períodos de tempo ao tecido hepático, levando a quadros inflamatórios. O fígado tem por padrão responder a essas agressões crônicas através do processo fibrogênico, que é dinâmico e regulável, com participação de diversos tipos celulares e mediadores inflamatórios. As principais células envolvidas na fibrogênese hepática são as células estreladas hepáticas (CEH), tendo como principal mediador químico o fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- β 1) (31).

Basicamente, a participação das CHE na fibrogênese hepática inicia-se através de um processo chamado de ativação, no qual as CEH saem de seu estado quiescente (CHEq) para seu estado ativado (CHEa). Como resultado final dessa transformação, ocorre um acúmulo excessivo de fibras de colágeno tipo 1 na matriz extracelular (MEC) denominada fibrose hepática. Esse processo de ativação ocorre pela atividade de diversas citocinas inflamatórias nas CEHq, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral α (TNF- α). Interleucina 1 (IL-1), e a principal delas, TGF- β 1 (32).

1.4.1 Ativação de CEHq, TGF- β 1, e o Inibidor de Proteína Morfogênica de Osso (BMP) e Ativina Ligado à Membrana (BAMBI)

Tendo em vista o papel central do TGF- β 1 no processo de ativação das CHEq e, por consequência, na fibrogênese hepática, é de fundamental importância o entendimento dos mecanismos pelos quais esse potente fator atua nessas células.

Em sua forma quiescente, as CEH possuem três principais tipos de receptores que atuam diretamente em seu processo de ativação: 1) Receptores semelhantes a Toll - 4 (TLR-4), aos quais são ligadas citocinas pró-inflamatórias oriundas de bactérias gram negativas intestinais que migram para o fígado via circulação portal, como os lipopolissacarídeos (LPS); 2) Receptores TGF- β R1, aos quais se ligam especificamente moléculas de TGF- β 1; e 3) Pseudorreceptores BAMBI, aos quais também se ligam moléculas de TGF- β 1(33, 34). Para a ativação, e subsequente transdiferenciação de CEHq para CEHa, esses receptores apresentam uma interrelação importante.

Após agressões hepáticas ocorre intensa síntese de TGF- β 1 por diversos tipos celulares, principalmente hepatócitos, células de Kupffer (CK), e células endoteliais sinusoidais. Nas CEHq, o TGF- β 1 se ligará tanto aos receptores TGF- β R1, fosforilando vias de sinalização intracelular, Smad2/Smad3, que acarretará na ativação dessas CEHq e, portanto, síntese de fibras colágeno I, quanto aos pseudorreceptores BAMBI, que não possuem domínio quinase intracelular, atuando como um competidor inócuo do TGF- β R1 por moléculas de TGF- β 1. Dessa forma, o BAMBI atua bloqueando ou diminuindo a atividade do TGF- β 1 nas CEHq (32, 33, 34).

Para que o TGF- β 1 consiga atuar de forma efetiva, os LPS se ligam aos receptores TLR-4 que ativam vias de sinalização do NF κ B e outras citocinas pró-inflamatórias, e inibem o BAMBI. Assim, a ativação do TLR-4 diminui a expressão do BAMBI, aumentando a oferta de TGF- β 1 para os receptores TGF- β R1 e, portanto, potencializando o processo de ativação de CEHq para CEHa (Figura 2) (32, 33, 34).

Como o BAMBI possui um papel crucial no processo inflamatório/fibrogênico hepático, é de grande importância verificar sua possível relação com as doenças de caráter inflamatório como a HAI e o imunomodulador investigado HLA-G.

OBJETIVO

2 Objetivo

- Verificar possíveis inter-relações entre expressões de HLA-G, BAMBI em hepatócitos e graus de fibrose em biópsias de pacientes pré-tratamento.
- Verificar possíveis inter-relações entre expressões de HLA-G, BAMBI em hepatócitos e graus de inflamação em biópsias de pacientes pré-tratamento.
- Verificar possíveis inter-relações entre expressões de HLA-G e BAMBI em hepatócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI.
- Verificar possíveis inter-relações entre contagem de plasmócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI, e expressões de HLA-G e BAMBI.
- Verificar possíveis inter-relações entre HLA-G, BAMBI, HH, depósitos de ferro e graus de inflamação.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e Métodos

3.1 Casuística

Foram selecionadas biópsias parafinadas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto diagnosticados com HAI, de acordo com os seguintes critérios:

Crítérios de inclusão – Biópsias de pacientes, de qualquer idade e gênero, diagnosticados com HAI, submetidos (pré e pós) ou não (somente pré) ao tratamento padrão, associados ou não à HH.

Crítérios de exclusão – Biópsias de pacientes não diagnosticados com HAI e/ou diagnosticados com qualquer outra enfermidade hepática e/ou submetidos a procedimentos de transplante hepático, além de biópsias com material insuficiente para a quantificação de HLA-G e/ou BAMBI para um mesmo paciente.

A partir dessa seleção, obteve-se 42 pacientes com biópsias pré e pós-tratamento e 53 pacientes com biópsias somente pré-tratamento. O estadiamento dos graus de fibrose e inflamação seguiu os critérios METAVIR de classificação (Tabela 2). A relação das quantificações de depósitos de ferro e o estadiamento tanto do grau de fibrose quanto da inflamação foram revisadas nas preparações histológicas H&E, Masson e Perl's nos casos selecionados a partir do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foram considerados pacientes bons respondedores, o que tiveram o grau de fibrose reduzido após o tratamento e maus respondedores os que não apresentaram melhora ou ainda pioraram o grau de fibrose após o tratamento.

Tabela 2 - Estadiamento dos graus de fibrose e inflamação hepáticas segundo critérios METAVIR.

Grau	Inflamação	Grau	Fibrose
A0	Ausente	F0	Ausente
A1	Leve	F1	Fibrose Portal sem septos
A2	Moderada	F2	Fibrose Portal com raros septos
A3	Intensa	F3	Vários septos, com nódulos ocasionais, mas sem cirrose
—	—	F4	Cirrose

3.2 Imuno-Histoquímica

Biópsias parafinadas foram também submetidas ao procedimento de imuno-histoquímica. Resumidamente, secções de 4 µm de espessura montadas em lâminas revestida de poli-L-lisina foram desparafinados, reidratadas, imersos em 10 mmol/L de tampão citrato, pH 6,0 e submetidas a recuperação de epítipo induzida por calor para utilizar um bloqueio de vapor durante 45 min. As lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e imersas em peróxido de hidrogênio a 3% durante 20 minutos para bloquear a peroxidase endógena. A ligação de proteína não específica foi bloqueada com soro normal (estojo Vectastain Elite ABC Universal, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) durante 30 min. As secções foram então incubadas com um anticorpo primário monoclonal específico para ALH-G (11-436-C100, diluição 1:100, EXBIO Praha, Czech Republic), o anticorpo antiBAMBI (HPA010866-D79819, diluição 1:50, Sigma-Aldrich Ltda, São Paulo, Brasil) e o anticorpo antiplasmócito (NCL-END, diluição 1:100, Novocastra Laboratories, NewCastle, UK) durante 2 horas à temperatura ambiente (25°C) numa câmara úmida. Na sequência de lavagens em PBS, foi aplicado um anticorpo secundário biotinilado específico tabuleiro universal (kit Vectastain Elite ABC Universal) 34 durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o complexo (kit Vectastain Elite ABC Universal) biotina-avidina-peroxidase durante 30 min e desenvolvidos com o DAB – 3´diaminobenzidina (Vector Laboratories Inc.), por 5 min. As lâminas foram contrastadas com Hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com Permount (Biomeda, Foster City, CA, EUA). Como controles negativos, todas as amostras foram incubadas com um anticorpo controle pareadas para isótopo em condições idênticas.

Os Hepatócitos, tanto HLA-G quanto BAMBI positivos, e os plasmócitos foram contados em 5 campos microscópicos (aumento 400X), utilizando-se o software ImageJ, sendo os resultados expressos como porcentagem de células HLA-G e BAMBI positivas por campo microscópico. Os plasmócitos foram expressos em número total de células encontradas.

3.3 Pesquisa de genes HFE

A pesquisa de mutações para genes relacionados à HH nos pacientes foi realizada pelo Laboratório de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.4 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Inter-relações entre hepatócitos HLA-G positivos, BAMBI positivos, graus de fibrose e inflamação, e Hemocromatose foram determinadas pelos testes Mann-Whitney e correlação de Spearman. Todos os testes foram bicaudais e valores $p < 0,05$ considerados significantes.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Relações entre expressões de HLA-G, BAMBI em hepatócitos e graus de fibrose em biópsias de pacientes pré-tratamento.

Os resultados demonstraram aumento significativo nas expressões de HLA-G quando comparados os graus F1 e F2 ($p=0,009$) e F1 e F3 ($p=0,007$). Porém, não houve diferença estatística entre os graus F1 e F4 ($p=0,1$) (Figura 2). Na Figura 3 observa-se a marcação de HLA-G em hepatócitos.

A expressão do BAMBI foi significativamente maior comparando-se os graus F1 e F3 ($p=0,04$) e F1 e F4 ($p=0,04$) e não apresentou diferença estatística entre os graus F1 e F2 ($p=0,39$) (Figura 4). Na Figura 5 observa-se a marcação de BAMBI em hepatócitos.

Figura 2 – Gráficos representativos das relações estatísticas relacionando expressões de HLA-G e os diferentes graus de fibrose

Legenda: A – expressão de HLA-G nos graus F1 (Sli) e F2 (Mod); B – expressão de HLA-G nos graus F1 e F3 (Int); C – expressão de HLA-G nos graus F1 e F4 (Cir). Sli = leve; Mod = moderado; Int = intenso; Cir = cirrose.

Figura 3 – Fotomicrografia de imuno-histoquímica positiva para HLA-G em hepatócitos

Legenda: Circundados em vermelho são hepatócitos marcados positivamente para HLA-G, com coloração acastanhada. Nota-se grande quantidade de hepatócitos com intensa marcação positiva para HLA-G. A – leve; B – moderada; C – grave; D – cirrose.

Figura 4 - Gráficos representativos das relações estatísticas relacionando expressões de BAMBI e os diferentes graus de fibrose

Legenda: A – expressão de BAMBI nos graus F1 (Sli) e F2 (Mod); B – expressão de BAMBI nos graus F1 e F3 (Int); C – expressão de BAMBI nos graus F1 e F4 (Cir). Sli = leve; Mod = moderado; Int = intenso; Cir = cirrose.

Figura 5 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica positiva para BAMBI em hepatócitos

Legenda: Circundados em vermelho são hepatócitos marcados positivamente para BAMBI, com coloração acastanhada. Nota-se grande quantidade de hepatócitos com intensa marcação positiva para BAMBI. A – leve; B – moderada; C – grave; D – cirrose.

4.2 Relações entre expressões de HLA-G, BAMBI em hepatócitos e graus de inflamação em biópsias de pacientes pré-tratamento.

Houve aumento significativo na expressão de HLA-G quando comparamos os graus A1 ao A2 ($p=0,004$) e A1 ao A3 ($p= 0,03$) (Figura 6).

Figura 6 - Gráficos representativos das relações estatísticas relacionando expressões de HLA-G e os diferentes graus de inflamação

Legenda: A – relação de expressão de HLA-G nos graus A1 (Sli) e A2 (Mod); B – relação de expressão de HLA-G nos graus A1 e A3 (Sev). Sli = grau leve; Mod = grau moderado; Sev = grau severo/intenso.

Semelhante padrão estatístico foi observado quando relacionado BAMBI aos graus de inflamação: A1 x A2 ($p=0,02$) e A1 x A3 ($p=0,003$) (Figura 7).

Figura 7 - Gráficos representativos das relações estatísticas relacionando expressões de BAMBI e os diferentes graus de inflamação

Legenda: A – relação de expressão de BAMBI nos graus A1 (Sli) e A2 (Mod); B – relação de expressão de BAMBI nos graus A1 e A3 (Sev). Sli = grau leve; Mod = grau moderado; Sev = grau severo/intenso.

4.3 Relações entre expressões de HLA-G e BAMBI em hepatócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI

Os resultados demonstraram diminuição estatisticamente significativa na expressão de HLA-G em pacientes que responderam bem ao tratamento, quando comparadas as biópsias iniciais e as pós-tratamento ($p=0,03$). Tal diferença não foi observada entre os pacientes maus respondedores ($p=0,3$) (Figura 8).

Figura 8 - Gráfico representativo das relações estatísticas relacionando expressões de HLA-G nos grupos de pacientes submetidos ao tratamento padrão de HAI

Legenda: BI - maus respondedores no início do tratamento; BT - maus respondedores pós tratamento; GI - bons respondedores no início do tratamento; GT - bons respondedores pós tratamento.

Quanto ao BAMBI, houve aumento significativo em sua expressão quando comparados os grupos BI e BT ($p=0,03$) e diminuição na expressão de BAMBI comparando-se os grupos GI e GT ($p=0,03$) (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico representativo das relações estatísticas relacionando expressões de BAMBI nos grupos de pacientes submetidos ao tratamento padrão de HAI

Legenda: BI - maus respondedores no início do tratamento; BT - maus respondedores pós-tratamento; GI - bons respondedores no início do tratamento; GT - bons respondedores pós-tratamento.

4.4 Relações entre contagem de plasmócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI, e expressões de HLA-G e BAMBI.

Os dados estatísticos demonstraram diminuição significativa nas quantificações de plasmócitos ao compararmos os grupos GI e GT ($p=0,04$), porém sem diferença significativa entre os grupos BI e BT ($p=0,31$) (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico representativo das relações estatísticas relacionando a quantidade de plasmócitos nos grupos de pacientes submetidos ao tratamento padrão de HAI

Legenda: BI - maus respondedores no início do tratamento; BT - maus respondedores pós tratamento; GI - bons respondedores no início do tratamento; GT - bons respondedores pós tratamento.

Entretanto, não houve quaisquer relações significantes entre a quantidade de plasmócitos e as expressões de HLA-G e BAMBI.

Na Figura 10 podemos observar a marcação de plasmócitos em pacientes pré e pós-tratamento bons e maus respondedores.

Figura 10 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica positiva para plasmócitos

Legenda: Setas em vermelho apontam plasmócitos marcados com coloração acastanhada. Nota-se grande diferença na quantidade de plasmócitos entre pré (A) e pós tratamento (B) em pacientes maus respondedores, e entre pré (C) e pós tratamento (D) em bons respondedores. Nota-se também a diferença entre pacientes pós tratamento bons (B) e maus (D) respondedores.

4.5 Relações entre HLA-G, BAMBI, HH, depósitos de ferro e graus de inflamação.

Nenhuma das correlações realizadas entre a presença de mutações no gene HFE, presentes na HH, e expressões de HLA-G e BAMBI demonstraram dados estatisticamente relevantes ($p > 0,05$). Também não foram encontradas relações significantes entre as expressões de HLA-G, BAMBI, hemossiderose (depósitos de ferro) ou a presença do gene da HH ($p > 0,05$), bem como entre os depósitos de ferro e graus de inflamação ($p > 0,05$).

5 Discussão

Para se compreender a possibilidade de relações entre a HAI e moléculas de HLA-G e BAMBI, assim como entre HLA-G e BAMBI e os depósitos de ferro na HAI, faz-se necessário uma visão mais ampla dos eventos que culminam na HAI – como as associações genéticas, mediadores celulares e mecanismos de dano hepático que também podem ser influenciados pelos depósitos de ferro. Com o intuito de facilitar o entendimento, esses eventos serão apresentados em subitens.

5.1 Relações entre expressões de HLA-G em hepatócitos, graus de fibrose e inflamação na HAI

Diante dos dados, observou-se o aumento da expressão de HLA-G em hepatócitos nos crescentes graus de fibrose, F2 e F3 quando comparados ao grau mais brando (F1), no entanto, embora também tenha existido um aumento, não se observa significância estatística quando comparados os graus F1 e F4. Observa-se também aumento significativo da expressão de HLA-G nos graus de inflamação A2 e A3 quando comparados ao A1. Muito embora não tenha existido significância na comparação F1 x F4, os dados demonstram uma forte relação entre os processos inflamatórios e fibrogênicos e a expressão de HLA-G.

De fato, a relação entre inflamação e fibrose é amplamente estudada e conhecida. Como mencionado na introdução, a fibrogênese é regulada por diversas populações celulares e mediadores inflamatórios que desencadeiam a ativação das células estreladas hepáticas, principais responsáveis pelo processo fibrogênico hepático (31, 32). Portanto, é esperado que ocorra uma relação proporcional entre fibrose e inflamação. Assim, com o agravamento do quadro inflamatório, ocorre também um progresso no processo de fibrose. Mas qual seria a relação desses eventos com o HLA-G? E o que poderia explicar a não significância na relação de fibrose dos graus F1 e F4?

A resposta à primeira questão está baseada nos próprios mecanismos inflamatórios do processo fibrogênico. A agressão aos hepatócitos na HAI começa após o reconhecimento de peptídeos autoantigênicos por um HLA de classe II (diferente do HLA-G, de classe I). Esse reconhecimento desencadeia uma série de eventos que culmina na ativação e diferenciação de células Th0 em Th1, Th2 e Th17. As Th1 secretam IL-2 e IFN- γ , os quais estimulam células CD8, ativam monócitos/macrófagos e aumentam a expressão tanto de moléculas de HLA de classe

I, quanto de classe II nos hepatócitos (15,20). Além do fato de diversos estudos apontarem sua função importante como imunorregulador no controle de várias doenças autoimunes e inflamatórias, o HLA-G interage com receptores ILT-2, ILT-4, KIR2DL4 e CD160, ativando e regulando diversos tipos celulares envolvidos na patogenia da HAI: linfócitos T e B, NKs, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células epiteliais (22, 23, 24). Assim, a relação entre as três variáveis, HLA-G, grau de fibrose e inflamação, se apresenta de forma proporcional. Conforme se agrava o quadro inflamatório, ocorre aumento do processo fibrogênico e, concomitantemente, aumento da expressão de HLA-G como imunorregulador na tentativa de controlar a progressão da inflamação.

Para responder à segunda questão e pensando na relação acima exposta, deve-se compreender a constituição do microambiente do grau F4 da classificação METAVIR de fibrose hepática. Nesse grau, há o estabelecimento do quadro de cirrose hepática e, portanto, diminuição do número de hepatócitos e sua substituição por tecido fibroso devido à cronicidade inflamatória e agressão às células hepáticas (32,33). Conforme descrito anteriormente, uma das consequências do processo inflamatório autoimune é justamente o estímulo de expressão de HLA-G em hepatócitos via ativação de Th0 em Th1 (15,20). Como no quadro de cirrose hepática (grau F4) o número de hepatócitos encontra-se diminuído devido sua substituição por tecido fibroso, é compreensível e esperado que esse aumento de expressão de HLA-G em F4 esteja em declínio, como sugere os dados estatísticos da relação F1 x F4.

5.2 Relações entre expressões de BAMBI em hepatócitos, graus de fibrose e inflamação na HAI

Os dados estatísticos demonstram que as relações entre as expressões de BAMBI seguem padrão crescente e proporcional com os graus de fibrose e inflamação, semelhante ao que ocorre com as expressões de HLA-G.

No entanto, nesse caso, as significâncias foram obtidas nas relações entre F1 e F3 e F1 e F4, com não significância na relação entre F1 e F2. As relações de expressões de BAMBI com graus de inflamação, A1 x A2 e A1 x A3, apresentaram significância estatística. Esses padrões podem ser entendidos quando se relembra a relação entre BAMBI e as células estreladas hepáticas nos processos inflamatórios e fibrogênicos.

Após agressões hepáticas, diversos tipos celulares, como hepatócitos, células de Kupffer (CK), e células endoteliais sinusoidais começam a sintetizar e liberar grandes quantidades de TGF- β 1. Esse potente fator fibrogênico atua no processo de ativação e transdiferenciação das células estreladas hepáticas quiescentes em células estreladas hepáticas ativadas, as principais células do processo fibrogênico. As células estreladas hepáticas possuem, principalmente, receptores TLR-4 para citocinas pró-inflamatórias (como as LPS), receptores TGF- β R1 para TGF- β 1 (processo de ativação das células estreladas hepáticas), e os pseudorreceptores BAMBI que também se ligam ao TGF- β 1. Portanto, o BAMBI atua como um competidor do receptor TGF- β R1 por moléculas de TGF- β 1, diminuindo sua atividade nas próprias células estreladas hepáticas quiescentes (33, 34).

Esses diferentes tipos de receptores encontrados nas células estreladas hepáticas apresentam inter-relações importantes na ação do TGF- β 1 para ativar e transdiferenciar células estreladas hepáticas quiescentes em ativadas. Resumidamente, os receptores TLR-4, ativados por LPS decorrentes das agressões hepáticas, induzem vias de sinalização de NF κ B, a qual é responsável por inibir a atividade do BAMBI. Dessa forma, sem o BAMBI para atuar como receptor concorrente, os receptores TGF- β R1 têm um aumento expressivo na oferta e atividade de moléculas de TGF- β 1 e, por consequência, maior grau de transdiferenciação de células estreladas hepáticas quiescentes em ativadas e aumento de fibrogênese hepática (32, 33, 34).

Pelos mecanismos descritos, pode-se perceber a importância do BAMBI nas células estreladas hepáticas. De fato, a expressão hepática de BAMBI é descrita como sendo exclusivamente realizada pelas células estreladas hepáticas (35). Isso ajudaria a explicar os resultados obtidos nas análises caso a quantificação da expressão de BAMBI tivesse sido realizada em células estreladas hepáticas. No entanto, a quantificação foi realizada em hepatócitos, não em células estreladas hepáticas. Então, se a expressão hepática de BAMBI é exclusiva de células estreladas hepáticas, como poderia ser explicado o fato desse pseudorreceptor também ser expressado por hepatócitos?

Para esclarecer essa questão, é de suma importância se analisar outras características relacionadas aos processos de diferenciação e transdiferenciação celulares envolvidos na homeostasia hepática e em circunstâncias patológicas.

Reconhecidamente o fígado possui uma extraordinária capacidade regenerativa, a qual ocorre devido à divisão de hepatócitos maduros e colangiócitos hepáticos que saem de seu estado mitótico quiescente, conhecido como G0, e entram no ciclo celular para sofrerem mitose (36). Caso a agressão hepática se torne crônica, como no caso da HAI, esse processo de regeneração pode se tornar ineficiente e, dessa forma, outros processos podem ser iniciados. O fígado possui células tronco adultas residentes chamadas células progenitoras hepáticas (CPH) que expressam marcadores de diversas linhagens celulares hepáticas que, nessa situação de cronicidade, podem ser ativadas e se diferenciar tanto em hepatócitos quanto em células estreladas hepáticas, participando, portanto, do processo de fibrogênese hepática (37).

Com base nisso, uma possível explicação para a expressão de BAMBI por hepatócitos é o fato de que tanto eles quanto as células estreladas hepáticas possuem uma assinatura genética, como genes do BAMBI, de suas células progenitoras (CPH). Nesse caso, essa expressão do BAMBI poderia ocorrer por 2 hipóteses: 1) com uma alta demanda de hepatócitos devido às agressões hepáticas, as CPH não se submeteriam por completo a todo o processo de diferenciação, fazendo com que os hepatócitos oriundos desse processo expressassem genes “ancestrais” das CPH; 2) também devido às agressões hepáticas, aos altos graus inflamatórios e, somado à isso, aos grandes níveis de TGF- β 1 presentes no microambiente, via mecanismo de *feedback* positivo os hepatócitos poderiam reexpressar genes de proteínas que podem controlar e diminuir a atividade pró inflamatória do TGF- β 1, como o BAMBI (Figura 11).

Ademais, um estudo envolvendo infecção por hepatite B demonstrou que hepatócitos podem reexpressar diversos genes normalmente expressos pelas CPH, inclusive o próprio BAMBI (38), reforçando a possibilidade da segunda hipótese. Um outro estudo realizado em hepatócitos primários humanos (HPH), oriundos de pacientes submetidos a hepatectomia para tumores hepáticos metastáticos de câncer colorretal, demonstrou que essas células também foram capazes de expressar BAMBI (35).

Ainda assim, mais estudos são necessários para podermos responder a questão da expressão de BAMBI por hepatócitos em HAI de forma mais contundente.

nos processos imunológicos e inflamatórios, o que levou a um aumento na demanda por substâncias imunorreguladoras, no caso, o HLA-G.

Quanto ao BAMBI, obteve-se o mesmo padrão de resposta em ambas as situações, com diminuição significativa na relação GI x GT, e aumento, agora estatisticamente significativo, na relação BI x BT. A razão para o HLA-G e o BAMBI apresentarem esses mesmos padrões de resposta se dá pelo fato de que ambas são substâncias de *feedback* negativo para processos inflamatórios, aumentando ou diminuindo suas expressões em hepatócitos conforme a demanda por compostos imunorreguladores. Ou seja, quanto maior a inflamação, maior a demanda por HLA-G e BAMBI e maior suas expressões em hepatócitos.

Assim, como ocorreu com o HLA-G, o BAMBI demonstrou aumento de sua expressão no grupo BT frente ao BI devido a não resposta dos pacientes ao tratamento imunossupressor, levando ao agravamento do quadro inflamatório e consequente aumento na demanda de BAMBI. De forma oposta, o BAMBI teve sua expressão diminuída porque os pacientes do grupo GT frente ao GI responderam ao tratamento imunossupressor, o qual amenizou o quadro inflamatório e diminuiu sua demanda.

Um ponto interessante a ser destacado é que, quando se compara os níveis de BAMBI nos grupos pré-tratamento (GI e BI), observa-se uma grande diferença em sua expressão. Os pacientes do grupo GI apresentaram níveis muito superiores aos do grupo BI. Isso sugere que os níveis de BAMBI podem ser um fator preditivo para boa resposta ao tratamento imunossupressor da HAI. Assim, quanto maior os níveis de BAMBI, maior a possibilidade desses pacientes responderem bem ao tratamento.

5.4 Relações entre contagem de plasmócitos nos grupos bons e maus respondedores ao tratamento padrão para a HAI, e expressões de HLA-G e BAMBI

Os plasmócitos fazem parte do infiltrado inflamatório característico dos achados histológicos da HAI. Sua importância pode ser entendida nos mecanismos de resposta autoimune.

No início dessa resposta a CAA ativa o Th0 ao apresentar o autoanticorpo ligado em um HLA de classe II. Após sua ativação, um dos destinos do Th0 é se diferenciar em Th2, o qual será responsável pela maturação de linfócitos B em plasmócitos. Os plasmócitos sintetizam e liberam imunoglobulinas (anticorpos) que se

ligam e “marcam” os hepatócitos para que células citotóxicas os reconheçam (3, 8, 15).

Devido à sua importância na resposta autoimune e os resultados encontrados relacionando o HLA-G e o BAMBI à HAI, suspeitou-se que poderia haver alguma relação entre esses três componentes: plasmócitos, HLA-G e BAMBI.

Outra característica que poderia corroborar essas suspeitas é que o HLA-G pode se apresentar em isoformas ligadas à membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e em isoformas solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7) (21, 22, 23), e justamente por sua característica solúvel, essas isoformas poderiam apresentar alguma atividade parácrina em outras células imunológicas envolvidas nos mecanismos patogênicos da HAI, como os plasmócitos. No entanto, nenhuma das análises realizadas apresentou quaisquer correlações entre o número de plasmócitos e a expressão de HLA-G.

Esses resultados sugerem que: ou as isoformas expressadas nos hepatócitos são ligadas à membrana (insolúveis) e não possuem a capacidade de atuar diretamente em outras células daquele microambiente (ação parácrina); ou, mesmo sendo solúveis, o HLA-G simplesmente não possui atividade que possa influenciar, direta ou indiretamente, no número de plasmócitos do microambiente.

Já em relação ao BAMBI, também não foi encontrada correlação significativa entre sua expressão e a quantidade de plasmócitos.

Como os resultados de sua expressão em hepatócitos sugerem, o BAMBI poderia atuar principalmente na regulação da síntese e atividade do TGF- β . Uma das principais funções do TGF- β na HAI é regular diferentes células envolvidas nos processos imunológicos, aumentando ou diminuindo suas funções. TGF- β pode diminuir esses processos ao estimular células Treg, as quais inibem a ativação de Th0 e sua consequente diferenciação em células efetoras (Th1, Th2 e Th17) de cascatas imunológicas da HAI. No entanto, o TGF- β também pode aumentar os processos imunológicos ao estimular a ativação das células estreladas hepáticas que por sua vez aumentam a atividade imunológica ao liberar diversas citocinas e substâncias quimiotáticas que recrutam essas células imunológicas (31, 32).

Seja qual for sua atividade preponderante na HAI, segundo os resultados a expressão de BAMBI por hepatócitos parece não exercer influência na quantidade de plasmócitos.

5.5 Relações entre HLA-G, BAMBI, HH, depósitos de ferro e graus de inflamação.

Diversos estudos relacionam a HH às condições autoimunes (28). Além disso, o gene HFE, mutado na HH, se localiza no mesmo *locus* do HLA, portanto também pertence ao CPH e suas mutações alteram os alelos ALH de classe 1, HLA-A e HLA-B, mesma classe do HLA-G (25, 28). Todos esses mecanismos levam, em última análise, ao acúmulo de ferro no fígado (hemossiderose), o qual pode ocasionar um agravamento do grau inflamatório hepático. De fato, estudos demonstraram que a hemossiderose pode ser responsável pelo aumento no grau de inflamação de diversas hepatopatias (39,40).

Somando essas características da HH e hemossiderose ao fato de que, como discutido anteriormente, supõe-se que exista um mecanismo de *feedback* positivo de ALH-G e BAMBI ao aumento da inflamação, o grau inflamatório se torna um elo entre todas essas variáveis: HH, hemossiderose, HLA-G e BAMBI.

Assim, levantou-se a hipótese de que seria possível que a hemossiderose, por HH ou outra etiologia, influenciasse as expressões de HLA-G e BAMBI em hepatócitos. No entanto, os resultados demonstram que não houve relação significativa entre HH ou hemossiderose não relacionada à HH e graus de inflamação, expressões de HLA-G e BAMBI.

Esses resultados sugerem que a HH/hemossiderose não foi capaz de agravar o quadro inflamatório dos pacientes com HAI. Com o grau de inflamação estagnado o mecanismo de *feedback* positivo que o aumento da inflamação exerce sobre HLA-G e BAMBI são interrompidos. Dessa forma, a HH/hemossiderose também não influenciou as expressões de HLA-G e BAMBI.

É interessante salientar que esses resultados contrariam a literatura no que tange à influência da hemossiderose em pacientes com outras hepatopatias, nas quais os depósitos de ferro podem agravar consideravelmente o quadro inflamatório dos pacientes. Possivelmente essa diferença na influência da hemossiderose no grau inflamatório ocorre pelo fato de que os pacientes com HAI atingem um alto grau inflamatório de forma súbita, não deixando margem para que o acúmulo de ferro consiga agravar ainda mais esse quadro. O mesmo não ocorre em pacientes com outras hepatopatias que apresentam um espectro mais amplo do grau inflamatório (do leve ao grave). Dessa forma, a hemossiderose pode influenciar no agravamento da inflamação nesses pacientes.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

Verificou-se a existência de relações entre expressões de HLA-G e BAMBI em hepatócitos e os processos inflamatórios/fibrogênicos hepáticos na HAI em pacientes pré-tratamento, com aumento dessas expressões conforme agravamento tanto de inflamação quanto de fibrose. Esse padrão de resposta provavelmente se deve a mecanismos de *feedback* positivo para HLA-G e BAMBI de acordo a demanda por substâncias imunorreguladoras. A expressão de BAMBI em hepatócitos possivelmente ocorreu por reexpressão de genes “ancestrais” das células que os originam (as CPH).

Também se verificou a existência dessas relações quando se comparou pacientes pré x pós-tratados maus respondedores ao tratamento, com aumento de expressões de HLA-G e BAMBI nos pós-tratados devido suas altas demandas decorrentes da ineficiência do tratamento imunossupressor. De forma oposta, houve diminuição de suas expressões na comparação de pacientes pré x pós-tratados nos pacientes bons respondedores devido às suas baixas demandas decorrentes, agora, da eficiência do tratamento imunossupressor.

Não se obteve relações significantes entre expressões de HLA-G e BAMBI e a quantidade de plasmócitos em pacientes pré x pós-tratados bons e maus respondedores. A diminuição do número de plasmócitos nos grupos pós-tratados pode ter ocorrido devido à atividade imunossupressora do tratamento, mesmo nos maus respondedores, não se relacionando ao HLA-G e BAMBI.

Também não houve relação significativa entre HH ou hemossiderose e graus de inflamação, expressões de HLA-G e BAMBI em pacientes com HAI, contrariando a literatura que descreve essa relação em pacientes com outras hepatopatias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- 1 Desmet VJ, et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994 Jun;19(6): 1513-1520. doi: 10.1002/hep.1840190629.
- 2 Makol A, Watt KD, Chowdhary VR. Autoimmune Hepatitis: A Review of Current Diagnosis and Treatment. *Hepat Res Treat*. 2011 May;2011; 11 pages. doi: 10.1155/2011/390916.
- 3 Porta G. Hepatite auto-imune. *J Pediatr*. 2000 Mar;76(2):181-6.
- 4 Macfarlane IG. Definition and classification of autoimmune hepatitis. *Sem Liver Dis*. 2002 Nov;22(4):317-323. doi: 10.1055/s-2002-35702
- 5 Homberg JC, et al, Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidneymicrosome antibody type 1: a second type of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1987 Nov-Dec;7(6):1333-9. doi: 10.1002/hep.1840070626.
- 6 Martini E, et al. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis Type 2. *Hepatology*. 1988 Nov;8(6):1662-6. doi: 10.1002/hep.1840080632.
- 7 Aizawa Y, Hokari A. Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects. *Clin Exp Gastroenterol*. 2017 Jan;19(10):9-18. doi: 10.2147/CEG.S101440.
- 8 Liberal R, et al. Autoimmune hepatitis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2013 Mar;41:126-39. doi: 10.1016/j.jaut.2012.11.002.
- 9 Floreani A, et al. Autoimmune hepatitis: Contrasts and comparisons in children and adults - a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2013 Oct;46:7-16. doi: 10.1016/j.jaut.2013.08.004.
- 10 Germano V, et al. Autoimmune hepatitis associated with infliximab in a patient with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Oct;64(10):1519-20. doi: 10.1136/ard.2004.032821.
- 11 Goldstein NS, et al. Minocycline as a cause of drug-induced autoimmune hepatitis: report of four cases and comparison with autoimmune hepatitis. *Am J Clin Pathol*. 2000 Oct;114(4):591-8. doi: 10.1309/KV2J-VX6Q-L95V-VDE4.
- 12 Pelli N, Setti M. Atorvastatin as a trigger of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2004 Apr;40(4):716. doi: 10.1016/j.jhep.2003.12.022.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

- 13 Berry PA, Smith-Laing G. Hepatitis A vaccine associated with autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2007 Apr 21;13(15):2238-9. doi: 10.3748/wjg.v13.i15.2238.
- 14 Kamiyama T, et al. Autoimmune hepatitis triggered by administration of an herbal medicine. *Am J Gastroenterol.* 1997 Apr;92(4):703-4.
- 15 Liberal R, et al. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011 Dec;25(6):653-64. doi: 10.1016/j.bpg.2011.09.009.
- 16 Vergani D, et al. Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. 1987 Dec;7(6):307-15. doi: 10.1111/j.1600-0676.1987.tb00361.x.
- 17 Vergani GM, et al. Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol.* 1979 Oct;38(1):16-21.
- 18 Ma Y, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology.* 2002 Mar;35(3):658-64. doi: 10.1053/jhep.2002.32092.
- 19 Longhi MS, et al. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol.* 2004 Jul;41(1):31-7. doi: 10.1016/j.jhep.2004.03.008.
- 20 Longhi MS, et al. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2010 Feb;34(1):7-14. doi: 10.1016/j.jaut.2009.08.010.
- 21 Alves C, et al. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. *Rev Bras Saude Mater Infant.* 2007 Dec;7(4):357-63. doi: 10.1590/S1519-38292007000400002.
- 22 Alegre E, et al. Some Basic Aspects of HLA-G Biology. *J Immunol Res.* 2014 Apr;2014:[10 p.]. doi: 10.1155/2014/657625.
- 23 Morandi F, et al. Recent Advances in Our Understanding of HLA-G Biology: Lessons from a Wide Spectrum of Human Diseases. *J Immunol Res.* 2016;(2016):[14p.]. doi: 10.1155/2016/4326495.
- 24 Curigliano G, et al. Molecular Pathways: Human Leukocyte Antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res.* 2013 Oct;15(19):5564-71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3697.
- 25 Rodriguez LM, et al. Ancestral association between HLA and HFE H63D and C282Y gene mutations from northwest Colombia. *Genet Mol Biol.* 2015 Mar;38(1):8-13. doi: 10.1590/S1415-475738120140080.

- 26 Hollerer I, Bachmann A, Muckenthaler MU. Pathophysiological consequences and benefits of HFE mutations - 20 years of research. *Haematologica*. 2017 Mar 9. pii: haematol.2016.160432. doi: 10.3324/haematol.2016.160432.
- 27 Bauduer F. C282Y/H63D hemochromatosis mutations and microevolution: Speculations concerning the Basque population. *Homo*. 2017 Jan;68(1):38-41. doi: 10.1016/j.jchb.2016.12.004.
- 28 Barton JC, Barton JC. Autoimmune Conditions in 235 Hemochromatosis Proband with HFE C282Y Homozygosity and Their First-Degree Relatives. *J Immunol Res*. 2015 Oct;2015:[11 p.]. doi: 10.1155/2015/453046.
- 29 Feder JN, et al. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem*. 1997 May;272(22):14025-8. doi: 10.1074/jbc.272.22.14025.
- 30 Waheed A, et al. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov;94(23):12384-9.
- 31 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*. 2001 Aug;21(3):397-416. doi: 10.1055/s-2001-17554.
- 32 Zhou WC, Zhang Q-B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014 June;20(23):7312-7324. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7312.
- 33 C M, et al. Cell Signals Influencing Hepatic Fibrosis. *Int J Hepatol*. 2012 Aug;2012:[18 p.]. doi: 10.1155/2012/158547.
- 34 Zhao HW, et al. Oxymatrine attenuates CCl4-induced hepatic fibrosis via modulation of TLR4-dependent inflammatory and TGF- β 1 signaling pathways. *Int Immunopharmacol*. 2016 Jul;36:249-55. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.040.
- 35 Wanninger J, et al. Adiponectin induces the transforming growth factor decoy receptor BAMBI in human hepatocytes. *FEBS Lett*. 2011 May;6:585(9):1338-44. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.003.
- 36 Boulter L, Lu WY, Forbes SJ. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J Clin Invest*. 2013 May;123(5):1867-73. doi: 10.1172/JCI66026.
- 37 Chen j, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver Int*. 2017 Jan; 2017:1–12. doi: 10.1111/liv.13377.
- 38 Mani SK, et al. EpCAM-regulated intramembrane proteolysis induces a cancer stem cell-like gene signature in hepatitis B virus-infected hepatocytes. *J Hepatol*. 2016 Nov;65(5):888-898. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.022.

39 Martinelli AL, et al. Liver iron deposits in hepatitis B patients: association with severity of liver disease but not with hemochromatosis gene mutations. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep;19(9):1036-41. doi: 10.1111/j.1440-1746.2004.03410.x.

40 Martinelli AL, Ramalho LN, Zucoloto S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Jan;19(1):91-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2004.03255.x.

ANEXO - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UPC
HCFMRP - USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

HC
USP - RIBEIRÃO
ambulatório - ensino - pesquisa

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 13 de NOVEMBRO 2013.

Ilustríssima Senhora
Dr.^a Marcia Guimarães Villanova
MD, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Sistema UPC nº 7296

Senhora Coordenadora,
Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado
PAPEL DA TRANSFERÊNCIA DAS CÉLULAS GASTRODAS TÓNICAS NA VENTIL
ARTOTOMIA HUMANA

juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.
O projeto acima mencionado será desenvolvido no (a) DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E
NEFROLOGIA

Informo também que o pesquisador responsável e o orientador possuem currículo Lattes.
O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao
Comitê e foi APROVADO.

Equipe Técnica UPC
Henrique C. Carvalho
Esquadrário
Matrícula: 5278

Atenciosamente,

SÉRGIO SOUZA FIGUEIREDO *Souza*
Pesquisador Principal ou Aluno (nome completo e assinatura)

LEANDRA NAÍRA ZAMBELLI RANALHO *Leandra Naira Zambelli Ranallo*
Pesquisador Principal ou Orientador (nome completo e assinatura)

De acordo:
Prof. Dr. Luciano Nader Serafini
Professor Associado e Chefe do Depto
de Patologia e Medicina Legal
Chefe de Departamento (assinatura e carimbo)
Matrícula 2532821 FMRP/USP

Chefe do Ambulatório/ Laboratório (assinatura e carimbo)

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone: (16) 3602-2956 FAX: 3602-2956