

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA**

**ANA PAULA BELTRAME FARINA PASINATO**

**Hepatite C crônica na fase cirrótica, efeito dos DAAs na histopatologia dos  
explantes**

**São Paulo  
2023**

**ANA PAULA BELTRAME FARINA PASINATO**

**Hepatite C crônica na fase cirrótica, efeito dos DAAs na histopatologia dos  
explantes**

**Versão Original**

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

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Venancio Avancini  
Ferreira Alves

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pasinato, Ana Paula Beltrame Farina  
Hepatite C crônica na fase cirrótica, efeito dos  
DAAs na histopatologia dos explantes / Ana Paula  
Beltrame Farina Pasinato. -- São Paulo, 2023.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Patologia.  
Orientador: Venancio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Vírus da hepatite C 2.Hepatite C  
crônica 3.Agentes antivirais de ação direta 4.Agentes  
antivirais de ação direta 5.Célula progenitora  
hepática 6.Células imunes

USP/FM/DEB-058/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Pasinato APBF. Hepatite C crônica na fase cirrótica, efeito dos DAAs na histopatologia dos explantes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Vera** e **Valter**, obrigada por tanto, pelo amor incondicional, e por sempre me mostrarem o alcance que só o conhecimento pode proporcionar.

**Bernardo** e **Julia**, meus amados filhos, a tese acabou, que o exemplo de resiliência, estudo e dedicação seja um de meus maiores ensinamentos e permaneça por toda vida de vocês!

Ao meu marido **Ivo**, obrigada por sempre compreender com amor. Te amo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Venancio Avancini Ferreira Alves pelos ensinamentos, apoio, exemplo, entusiasmo e por sempre acreditar. Foi um grande aprendizado a oportunidade de ter trabalhado ao seu lado.

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, pela amizade e apoio, com seu carisma e sabedoria únicos.

À amiga Camila Machado Baldavira pela sua paciência, inteligência, e comprometimento de sempre em me ajudar a tornar tudo possível.

À Daniella Serafin Couto Vieira, minha amiga, irmã de alma, por ter me mostrado a importância do caminho e a beleza de ser comprometida, simplesmente pelo prazer de sê-lo.

À amiga Gabriella Di Giunta Funchal, pela certeza de sempre poder contar, pela genialidade com que exerce a Patologia e por acreditar no quanto somos capazes.

À Aline, Sandra, Esmeralda e Ângela, pelas reações, realizadas sempre com competência e comprometimento.

À Lucia, Luciana e a todos funcionários da Divisão de Anatomia Patológica - HCFUSP e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP – FMUSP pela disponibilidade e apoio.

Às enfermeiras Patrícia Momoyo Yoshimura Zitelli e Juliana Marquezi Pereira por toda ajuda e informações.

À Jovana, Selma e demais colegas de trabalho, e aos meus residentes em Patologia do Hospital Universitário em Florianópolis, por toda compreensão e apoio durante a tese.

*“The credit belongs to the man who is fully in the arena of life, because there is no effort without mistakes and disappointments, but who actually knows enthusiasm, who gives himself to a worthy cause, who at best knows triumph in the end of the great conquest and who, at worst, if he fails, at least fails by daring greatly”.*

**Theodore Roosevelt**

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

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

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver)/ Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3. ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016.

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



## RESUMO

Pasinato APBF. Hepatite C crônica na fase cirrótica, efeito dos DAAs na histopatologia dos explantes [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** Apesar do sucesso do tratamento das hepatites C crônicas (HCC) através de agentes antivirais de ação direta (DAAs), com resposta virológica sustentada (RVS) em mais de 95 % dos casos, alguns estudos demonstraram a permanência de alterações necroinflamatórias e a falta de repercussão na regressão da fibrose mesmo em pacientes tratados que atingiram RVS. A ativação da célula progenitora hepática (CPH) tem sido correlacionada à maior gravidade em hepatopatias, em especial quando a regeneração por hepatócitos adultos vizinhos aos necróticos se torna insuficiente. O HCV exerce profundo impacto sobre o sistema imune do hospedeiro e diferentes células imunes atuam na patogênese, progressão e resultados do tratamento da infecção. **Objetivo:** Avaliar aspectos histológicos e imuno-histoquímicos da resposta tecidual em explantes hepáticos de pacientes com HCC tratados com DAAs, em comparação com explantes de pacientes não tratados HCV+. Especificamente, avaliar os principais marcadores histológicos de lesão hepática, a ativação da CPH através da reatividade para CK7, a expressão dos linfócitos BCD20+, TCD3+, TCD4+, TCD8+, da molécula coestimulatória negativa do checkpoint imune PD-1 e do fator de transcrição FOX-P3. **Métodos:** Foram incluídos 42 explantes hepáticos em pacientes com HCC, abrangendo 22 pacientes tratados com sucesso com DAAs e 20 com infecção ativa (HCV+). Realizamos análise histológica e imuno-histoquímica para avaliar a ativação da CPH através da reação para CK7 e a imunoexpressão das células imunes do microambiente hepático. **Resultados:** O grupo de pacientes tratados com DAAs apresentou diminuição da inflamação ( $p=0,027$ ) e atividade de interface perisseptal ( $p=0,005$ ), menor ativação da CPH ( $p=0,003$ ) e menor expressão de linfócitos BCD20+ ( $p=0,029$ ), TCD3+ ( $p=0,001$ ) e TCD8+ ( $p=0,005$ ) na interface perisseptal. **Conclusões:** O sucesso do tratamento com DAAs apresentou um efeito anti-inflamatório, com diminuições da inflamação e atividade de interface perisseptal, menor ativação da CPH e menor expressão de linfócitos BCD20+, TCD3+ e TCD8. Entretanto, tais alterações inflamatórias, mesmo em menor grau, persistem nos pacientes com RVS, tornando necessárias pesquisas futuras para abordar causas da persistência da inflamação e sua evolução em mais longo prazo.

**Descritores:** Vírus da hepatite C. Hepatite C crônica. Agentes antivirais de ação direta. Célula progenitora hepática. Células imunes.

## ABSTRACT

Pasinato APBF. Chronic hepatitis C in cirrhotic phase, DAAs effects in explants' histopathology [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

**Introduction:** Despite the successful outcome of chronic hepatitis C (CHC) through direct-acting antiviral agents (DAAs) with sustained virologic response (SVR) in over 95% of the cases, some studies have shown the persistence of necroinflammatory alterations and the lack of repercussion in fibrosis regression even in treated patients who achieved SVR. The activation of hepatic progenitor cell (HPC) has been correlated to a major aggravation in hepatopathies, specially when the regeneration from adult hepatocytes which neighbor the necrotic ones become insufficient. The hepatitis C virus (HCV) causes profound impact over the host's immune system and different immune cells act in the pathogenesis, progression and results of the infection's treatment. **OBJECTIVE:** To evaluate histologic and immunohistochemical impacts of the tissue response in liver explants of CHC patients treated with DAAs compared to the explants of HCV+-patients left untreated. Specifically, to evaluate the main histologic markers of hepatic lesions, the HPC activation through the CK7 reactivity, the expression of BCD20+, TCD3+, and TCD8+ lymphocytes, the negative costimulatory molecules of the PD-1 immune checkpoint, and the FOXP3 description factor. **Methods:** We Included 42 liver explants from CHC patients, with 22 patients successfully treated with DAAs and 20 with active infection (HCV+). We performed histologic and immunohistochemical analyses to assess the HPC activation through the CK7 reaction and the immunoexpression of immune cells in the liver microenvironment. **Results:** The group of patients treated with DAAs presented reduction in the inflammation ( $P=0.027$ ) and in the periseptal interface activity ( $P=0.005$ ), lower evidences of activation of HPC ( $P=0.003$ ), and lower expression of the BCD20+ ( $P=0.029$ ), TCD3+ ( $P=0.001$ ), and TCD8+ ( $P=0.005$ ) lymphocytes in the periseptal interface. **Conclusion:** The DAAs treatment success presented an anti-inflammatory effect, with lowering of inflammation and periseptal interface activity, lower HPC activation and lower expression of BCD20+, TCD3+, and TCD8 lymphocytes. However, these inflammatory alterations persist in SRV patients, although in a minor scale. This makes essential to develop further researches to cover the causes for inflammation persistency and its long-term evolution.

**Descriptors:** Hepatitis C virus. Hepatitis C, Chronic. Direct-Acting Antiviral Agents. Hepatic Progenitor Cell. Immune Cells.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs - células apresentadoras de antígenos  
CD - cirrose descompensada  
CHBI - célula hepatobiliar intermediária  
CHC - carcinoma hepatocelular  
CK - citoqueratinas  
CK7 - citoqueratina 7  
CPH - célula progenitora hepática  
CPI - célula progenitora isolada  
CTLs - linfócitos T citotóxicos CD8+  
DAAs - antivirais de ação direta  
DCs - células dendríticas  
EDI - estrutura ductular isolada  
HAV - vírus da hepatite A  
HBV - vírus da hepatite B  
HCC - hepatites C crônicas  
HCV - vírus da hepatite C  
HE - hematoxilina-eosina  
HRP - peroxidase de rábano silvestre  
IASL - Associação Internacional para o Estudo do Fígado  
IFN - interferon  
Ig - imunoglobulina  
IL - interleucina  
IRs - receptores inibitórios  
IRs- receptores inibitórios  
ITIM - motivo inibitório baseado em tirosina imunorreceptor  
iTregs - Tregs induzidas  
ITSM - motivo de troca baseado em tirosina imunorreceptor  
LTC - linfócitos T citotóxicos  
LTh - linfócitos T helper  
MELD - escores de doença hepática terminal  
NANBH - hepatite não-A, não-B  
NS5B - proteína não estrutural 5B

nTregs - Tregs naturais  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos  
PBS - tampão fosfato salino  
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas  
PEG-IFN - interferon peguilhado  
PTP - proteína tirosina fosfatase  
RBV - ribavirina  
RD - reação ductular  
RRPs - receptores de reconhecimento padrão  
RVS - resposta virológica sustentada  
RVS - resposta virológica sustentada  
SOF - sofosbuvir  
STATs - proteínas ativadoras de transcrição  
TCR - receptor de célula T  
Teff - células T efectoras  
TEM - transição epitélio-mesenquimal  
Tex - células T exauridas  
TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformador  
TH - transplante hepático  
TLR - receptores transmembrana Toll-like  
Tmem - células T de memória sustentada  
TNF - fator de necrose tumoral  
TNF - fator de necrose tumoral  
TNF $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa  
Tregs - células T reguladoras

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados comparativos das avaliações histopatológicas (Qui-quadrado).....	89
<b>Tabela 2.</b> Correlação entre variáveis histológicas .....	104
<b>Tabela 3.</b> Avaliação da reação para CK7 em padrão de células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI) em zona 1 (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	106
<b>Tabela 4.</b> Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	109
<b>Tabela 5.</b> Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando células progenitoras isoladas (CPI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	112
<b>Tabela 6.</b> Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando células progenitoras isoladas (CPI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	112
<b>Tabela 7.</b> Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando estruturas ductulares isoladas (EDI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	113
<b>Tabela 8.</b> Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando estruturas ductulares isoladas (EDI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	113
<b>Tabela 9.</b> Avaliação da reatividade para CK7 – escore final (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	114
<b>Tabela 10.</b> Avaliação da reatividade para CK7 – escore total (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	115
<b>Tabela 11.</b> Relação do escore final para CPH com as características histológicas .....	116
<b>Tabela 12.</b> Avaliação da reação de CK7 caracterizando reação ductular (RD), (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	117
<b>Tabela 13.</b> Frequência da reação para CK7 para reação ductular distribuída entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	119
<b>Tabela 14.</b> Frequência da expressão de CD20+ entre as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	122
<b>Tabela 15.</b> Frequência da expressão de CD20+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	122
<b>Tabela 16.</b> Frequência da expressão de CD3+ entre as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	125

<b>Tabela 17.</b> Frequência da expressão de CD3+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	125
<b>Tabela 18.</b> Frequência da expressão de CD4+ em comparação com as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	128
<b>Tabela 19.</b> Frequência da expressão de CD4+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	128
<b>Tabela 20.</b> Frequência da expressão de CD8+ entre as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	131
<b>Tabela 21.</b> Frequência da expressão de CD8+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	131
<b>Tabela 22.</b> Frequência da expressão de PD-1+ na região septal entre pacientes tratados e não tratados (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	133
<b>Tabela 23.</b> Frequência da expressão de PD-1+ na região septal entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	135
<b>Tabela 24.</b> Frequência da expressão de PD-1+ na região centrolobular entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	136
<b>Tabela 25.</b> Frequência da expressão de FOX-P3 na região septal entre pacientes tratados e não tratados (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	138
<b>Tabela 26.</b> Frequência da expressão de FOX-P3 na região septal entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson). .....	140
<b>Tabela 27.</b> Frequência da expressão de FOX-P3 na região centrolobular entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).....	141
<b>Tabela 28.</b> Dados demográficos e clínicos dos pacientes de estudo.....	176
<b>Tabela 29.</b> Dados pré transplante dos pacientes de estudo.....	177
<b>Tabela 30.</b> Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas necro-inflamatórias .....	178
<b>Tabela 31.</b> Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas de alterações arquiteturais .....	179
<b>Tabela 32.</b> Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas relacionadas à doença gordurosa .....	180
<b>Tabela 33.</b> Tempo de tratamento dos pacientes e semiquantificação atribuída as variáveis histológicas.....	181

<b>Tabela 34.</b> Tempo de tratamento dos pacientes e semiquantificação atribuída à reação para CK7.....	182
<b>Tabela 35.</b> Graus atribuídos à semiquantificação da reação para CK7 .....	183
<b>Tabela 36.</b> Quantificação dos marcadores imuno-histoquímicos de subtipos de linfócitos .....	184
<b>Tabela 37.</b> Graus atribuídos à semiquantificação da imunexpressão de PD-1 e FOX-P3 .....	185

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre prevalência do HCV e classificação de renda. Maior prevalência em países de renda mais baixa.....	31
Figura 2. Proporção genótipo e número total de infecções (representadas pelo tamanho do círculo) nas regiões por carga global da doença (GBD).....	34
Figura 3. Microanatomia biliar do fígado humano.....	46
Figura 4. Representação esquemática de tipos de células periportais com imunocoloração CK7 na hepatite C crônica, com as fotomicrografias reais desses constituintes demonstrados abaixo. ....	47
Figura 5. Curso natural da infecção pelo HCV .....	51
Figura 6. Resposta imune adaptativa específica na hepatite C.....	54
Figura 7. Exaustão de células T na antigenemia persistente e alta.....	57
Figura 8. Desenvolvimento da exaustão celular na persistência do antígeno (sinal 1) que leva a hiperativação da célula T e coexpressão sustentada de múltiplos receptores inibitórios nas células T e seus ligantes. Os receptores inibitórios fornecem sinais coestimulatórios negativos (sinal 2). O estado de inflamação crônica leva a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN-alfa e beta) e inibitórias (IL-10 e TGF-beta), que agem sinergicamente a exaustão. ....	60
Figura 9. Desenvolvimento de linfócitos T regulatórios naturais e induzidas. Linfócitos Tregs naturais (nTregs) são derivadas do timo e são caracterizadas pela coexpressão de CD4, alta expressão de CD25 e FOXP3, e são representadas coletivamente como CD4+CD25+FoxP3+ Tregs. As células T reguladoras induzidas ou adaptativas (iTregs) são geradas nos órgãos linfoides periféricos na presença do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e da interleucina-2 (IL 2). ....	62
Figura 10. Diferenciação de células T durante infecções agudas vs crônicas. ....	67
Figura 11. Ativação/inibição de células T. O receptor MHC classe II e o complexo antigênico são apresentados ao TCR. ....	67
Figura 12. Exaustão de células T pelo CD28 durante infecção crônica-viral e câncer ..	68
Figura 13. Fluxograma da seleção da amostra. ....	74
Figura 14. Exemplificação de estruturas positivas para CK7.....	82
Figura 15. Fluxograma das etapas para determinação do escore final de ativação das células progenitoras hepáticas (CPH).....	84
Figura 16. Exemplo da seleção dos diferentes campos representativos da interface perisseptal em uma amostra para quantificação no software QuPath. ....	86



Figura 17. Exemplos dos achados referentes aos diferentes graus de inflamação septal. .....	91
Figura 18. Exemplos dos achados da atividade de interface perisseptal. ....	92
Figura 19. Achados referentes aos diferentes graus de necrose lítica focal. ....	94
Figura 20. Exemplos de necrose confluyente. ....	95
Figura 21. Exemplos dos diferentes estádios de cirrose. ....	97
Figura 22. Aspectos das características de regressão da fibrose. ....	98
Figura 23. Exemplos de achados de esteatose. ....	101
Figura 24. Balonização hepatocelular. ....	102
Figura 25. Alterações histológicas caracterizando esteato-hepatite. ....	102
Figura 26. Representação dos diferentes graus avaliados para células progenitoras isoladas com reatividade CK7 em zona 1 do tecido hepático. ....	107
Figura 27. Diferentes graus de ativação de estruturas ductulares isoladas com imunoe expressão de CK7 em zona 1 do tecido hepático. ....	108
Figura 28. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para células progenitoras isoladas com imunoe expressão de CK7 em zonas 2 e 3 combinadas do tecido hepático. .....	110
Figura 29. Diferentes graus de ativação de estruturas ductulares isoladas com imunoe expressão de CK7 em zonas 2 e 3 combinadas do tecido hepático. ....	111
Figura 30. Representação dos diferentes graus avaliados para reação ductular (RD) marcada pela expressão de CK7 no tecido hepático. ....	118
Figura 31. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD20+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). ....	121
Figura 32. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD3+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). ....	124
Figura 33. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD4+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). ....	127
Figura 34. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD8+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). ....	130
Figura 35. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoe expressão de PD- 1 na região septal. (A) Grau 0 e (B) grau 1. ....	133

Figura 36. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoe expressão de PD-1 na região centrolobular. ....	134
Figura 37. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoe expressão de FOX-P3 na região septal. ....	138
Figura 38. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoe expressão de FOX-P3 na região centrolobular.....	139

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>25</b>
2.1	HEPATITE C	25
2.2	HISTÓRICO DA HEPATITE C	27
2.3	O VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)	27
2.4	EPIDEMIOLOGIA	29
2.5	EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL	32
2.6	GENÓTIPOS	33
2.7	TRATAMENTO	36
2.7.1	<i>MECANISMOS DE AÇÃO DOS DAAs</i>	38
2.7.2	<i>DIRETRIZES DO TRATAMENTO NO BRASIL</i>	39
2.7.3	<i>NOVAS QUESTÕES A SEREM CONSIDERADAS E O DESENVOLVIMENTO DA VACINA</i>	39
2.8	IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	40
2.8.1	<i>O ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO NA HEPATITE CRÔNICA</i>	41
2.8.1.1	<i>A AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA NO ESTADIAMENTO DAS HEPATITES CRÔNICAS</i>	42
2.8.1.2	<i>OS DIFERENTES ACHADOS HISTOLÓGICOS</i>	43
2.9	CITOQUERATINA 7 (CK7)	45
2.10	A RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HCV	49
2.10.1	<i>IMUNIDADE INATA</i>	49
2.10.2	<i>IMUNIDADE ADAPTATIVA</i>	52
2.10.2.1	<i>RESPOSTAS T CD4+</i>	52
2.10.2.2	<i>RESPOSTAS T CD8+</i>	55
2.10.3	<i>ESCAPE VIRAL</i>	55
2.10.4	<i>EXAUSTÃO DE CÉLULAS T CD8+</i>	56
2.10.5	<i>OUTROS COMPONENTES IMUNES NO HCV</i>	61
2.11	LINFÓCITOS TREGS E O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOX-P3	61
2.11.1	<i>TREGS NO HCV</i>	63
2.12	PROTEÍNA 1 DE MORTE PROGRAMADA (PD-1)	65
2.12.1	<i>PD1 NA HCV</i>	70
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>73</b>
4.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA	73
4.1.1	<i>ESTRATIFICAÇÃO DA AMOSTRA</i>	74
4.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	75
4.2.1	<i>ANÁLISE DA ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA</i>	76
4.2.2	<i>ANÁLISE DA ALTERAÇÃO ARQUITETURAL</i>	77
4.2.2.1	<i>FIBROSE</i>	77
4.2.2.2	<i>ESTADIAMENTO DA CIRROSE</i>	78
4.2.2.3	<i>ACHADOS DE REGRESSÃO DA FIBROSE</i>	78

4.2.3	ANÁLISE DOS ACHADOS RELACIONADOS A DOENÇA GORDUROSA HEPÁTICA .....	79
4.2.3.1	ESTEATOSE.....	79
4.2.3.2	BALONIZAÇÃO HEPATOCELULAR.....	79
4.2.3.3	ESTEATO-HEPATITE .....	79
4.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	79
4.3.1	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE PARA CITOQUERATINA 7 (CK7).....	81
4.3.1.1	ANÁLISE DAS RESPOSTAS INICIAIS DA CPH SOB A FORMA DE CÉLULAS PROGENITORAS ISOLADAS (CPI) E ESTRUTURAS DUCTULARES ISOLADAS (EDI).....	82
4.3.2	AVALIAÇÃO DOS ACHADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS NA RESPOSTA LINFOCITÁRIA ...	85
4.3.2.1	QUANTIFICAÇÃO POR ANÁLISE DE IMAGEM EM MÉTODO SEMIASSISTIDO.....	85
4.3.3	AVALIAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE PD-1+ E FOX-P3 .....	87
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	87
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>88</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	88
5.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	88
5.2.1	ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA .....	90
5.2.1.1	INFLAMAÇÃO SEPTAL .....	90
5.2.1.2	ATIVIDADE DE INTERFACE PERISSEPTAL .....	90
5.2.1.3	ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA NO COMPARTIMENTO LOBULAR.....	93
5.2.2	ALTERAÇÃO ARQUITETURAL.....	96
5.2.2.1	ESTÁDIO DA FIBROSE .....	96
5.2.2.2	ESTADIAMENTO DA CIRROSE .....	96
5.2.2.3	REGRESSÃO DA FIBROSE .....	96
5.2.3	ACHADOS RELACIONADOS A DOENÇA GORDUROSA.....	99
5.2.3.1	ESTEATOSE.....	99
5.2.3.2	BALONIZAÇÃO HEPATOCELULAR.....	99
5.2.3.3	ESTEATO-HEPATITE .....	100
5.3	CONSIDERAÇÕES QUANTO AO TEMPO DE TRATAMENTO .....	103
5.4	CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS .....	104
5.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	105
5.5.1	PADRÕES DE REATIVIDADE PARA CK7 COMO INDICADORES DE ATIVAÇÃO DA CÉLULA PROGENITORA HEPÁTICA (CPH).....	105
5.5.1.1	ANÁLISE DAS RESPOSTAS INICIAIS DA CPH SOB A FORMA DE CÉLULAS PROGENITORAS ISOLADAS (CPI) E ESTRUTURAS DUCTULARES ISOLADAS (EDI).....	105
5.5.1.2	ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA REATIVIDADE PARA CK7 NA REAÇÃO DUCTULAR (RD) EM TORNO À PLACA LIMITANTE.....	116
5.5.2	ACHADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS DA RESPOSTA LINFOCITÁRIA .....	120
5.5.2.1	LINFÓCITOS CD20+NA INTERFACE SEPTAL .....	120
5.5.2.2	LINFÓCITOS CD3+ NA INTERFACE SEPTAL .....	123
5.5.2.3	LINFÓCITOS CD4+ NA INTERFACE SEPTAL .....	126
5.5.2.4	LINFÓCITOS CD8+ NA INTERFACE SEPTAL .....	129
5.5.3	ANÁLISES SEMIQUANTITATIVAS DE LINFÓCITOS EXPRESSANDO PD-1 E FOX-P3 .	132

5.5.3.1	<i>SEMIQUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA COESTIMULATÓRIA NEGATIVA DO CHECKPOINT IMUNE PD-1</i> .....	132
5.5.3.2	<i>SEMIQUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOX-P3</i> .....	137
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>142</b>
6.1	ESTUDO HISTOLÓGICO .....	142
6.2	O ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA CITOQUERATINA 7 DESTACANDO A ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS (CPH) .....	146
6.3	IMUNOLOGIA.....	150
6.4	MOLÉCULA PD-1 E FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOX-P3 .....	153
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>156</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>157</b>
	<b>ANEXO A – DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES DE ESTUDO</b> .....	<b>176</b>
	<b>ANEXO B – GRAUS ATRIBUÍDOS À SEMIQUANTIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS ANALISADAS</b> .....	<b>178</b>
	<b>ANEXO C – TEMPO DE TRATAMENTO, VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS ANALISADAS E REAÇÃO PARA CK7</b> .....	<b>181</b>
	<b>ANEXO D – GRAUS ATRIBUÍDOS À SEMIQUANTIFICAÇÃO DA REAÇÃO PARA CK7</b> .....	<b>183</b>
	<b>ANEXO E – GRAUS ATRIBUÍDOS À QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE SUBTIPOS DE LINFÓCITOS</b> .....	<b>184</b>
	<b>ANEXO F – GRAUS ATRIBUÍDOS À SEMIQUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE PD-1 E FOX-P3</b> .....	<b>185</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é considerada a principal causa de doença hepática crônica no mundo, com índice global estimado em 58 milhões de indivíduos com infecção crônica e cerca de 400.000 mortes ao ano [1]. O advento dos agentes antivirais de ação direta (DAAs) representa uma conquista histórica no tratamento da infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV). São esquemas de tratamento elegíveis a todos os pacientes, associados a taxas de resposta virológica sustentada (RVS) acima de 90% e os pacientes são considerados efetivamente curados [2]. A RVS associada aos DAAs se correlaciona com risco significativamente menor de morbidade relacionada ao fígado e de mortalidade por todas as causas [3]. Essas medicações têm como alvo a “maquinaria” replicativa do HCV, conferindo notável eficácia quando incorporados aos esquemas de tratamento. O uso dos DAAs deu início a uma nova era em que a hepatite C crônica passou a ser considerada um modelo de doença altamente curável. Clinicamente, a erradicação da infecção é representada por RVS, definida como a ausência de nível detectável de RNA do HCV de 12 a 24 semanas após o término do tratamento [4].

A grande eficácia do tratamento com DAAs e a menor frequência de efeitos adversos tornaram os estudos histopatológicos menos essenciais, que eram até então grandes ferramentas para a indicação e o monitoramento da resposta de cada paciente submetido à terapia com interferons e ribavirina. Assim, a redução drástica de biópsias hepáticas resultou na correspondente queda do número de publicações sobre as alterações histológicas observadas após a terapia antiviral com DAAs, dentre essas, raros estudos que descrevem inflamação persistente e fibrose em alguns pacientes, apesar da cura da infecção [4, 5], sendo também poucos os trabalhos que mostram melhora da inflamação com o tratamento antiviral [6].

A hepatite C crônica tem sido uma indicação comum para transplante hepático (TH) na Europa e nos EUA, com mais de 20% dos candidatos da lista com infecção pelo HCV [7]. Até recentemente, com as terapias com IFN, as taxas de sobrevida esperada para receptores de fígados infectados pelo HCV eram as mais baixas entre todas as indicações devido à gravidade da doença de base, alto índice de recorrência e baixas taxas de cura [8]. Entretanto, em 2011, a aprovação dos DAAs de primeira geração, telaprevir e boceprevir, marcou o início de uma nova era. Em 2014, a introdução de DAAs mais potentes e melhor tolerados tornou essas medicações disponíveis para praticamente todos os pacientes. As elevadas taxas de RVS tendem a cursar com melhora da função hepática

após a conclusão do tratamento na maioria dos pacientes com cirrose descompensada (CD) e escores de doença hepática terminal (MELD) abaixo de 20. Além disso, a maioria dos pacientes com cirrose compensada tratados com DAAs não evolui clinicamente, e o transplante pode ser evitado, conferindo impacto aos novos antivirais no pré e pós-transplante hepático [9-11]. Em 2016, Belli et al. reportaram que 20% dos pacientes com hepatite C crônica foram retirados da lista de transplante hepático em um período de 60 semanas após a administração de DAAs [12].

As células progenitoras hepáticas (CPHs) são células bipotenciais que podem se diferenciar em linhagens biliares e hepatocíticas [13]. São células quiescentes no fígado saudável e se tornam ativas em certas doenças hepáticas, nas quais a capacidade regenerativa de hepatócitos maduros e/ou colangiócitos esteja prejudicada. A diferenciação em hepatócitos ocorre através de células hepatobiliares intermediárias (CHBIs), enquanto a diferenciação em linhagem biliar leva à formação de ductulos reativos atípicos [14]. Um método bastante eficaz para a identificação das CPHs é a pesquisa imuno-histoquímica de citoqueratina 7 (CK7), sendo que alguns autores propõem sua subdivisão em células progenitoras isoladas (CPIs), estruturas ductulares isoladas (EDIs) e reações ductulares (RDs) [15]. Na hepatite C crônica, a ativação da CPH, ou seja, o aumento no número e padrões morfológicos de diferenciação dessas células em linhagens hepatobiliares [16], ocorre apenas quando o dano e perda de hepatócitos e/ou colangiócitos são combinados com regeneração prejudicada de células maduras envolvidas [17]. A ativação da CPH é frequentemente observada com predomínio do padrão RD na região da interface perisseptal. A RD é um complexo multicelular dinâmico caracterizado pela presença de células epiteliais ductulares reativas, dispostas na margem do espaço porta ou septo em contato a células mesenquimais, inflamatórias e endoteliais [18].

A resposta imune desempenha papel central no curso e eliminação da infecção pelo HCV, e nas infecções crônicas, tal resposta pode ser muito alterada [19]. Considera-se que certas características imunológicas possam ser revigoradas com o tratamento antiviral, mas a persistência da funcionalidade alterada das células imunes pode contribuir para o dano hepático [20]. Após o tratamento com DAAs, permanecem questões sobre o impacto da eliminação do vírus sobre a restauração da homeostase imune e sobre a limitação do dano hepático em indivíduos curados [21].

Com a eliminação (*clearance*) viral, é razoável supor que, além do virtual desaparecimento do risco de retorno da replicação viral, as alterações histológicas

reduzam ou até desapareçam. Entretanto, dentre os poucos estudos histológicos de pós-tratamento com DAAs, há alguns que relatam que algumas alterações histológicas podem persistir e tal fato talvez esteja associado a graus diversos de esgotamento da resposta imune que eventualmente poderiam ocorrer inclusive depois do desaparecimento do vírus [5, 21].

O entendimento das consequências da funcionalidade alterada das células imunes na infecção crônica pelo HCV e das repercussões histológicas nessas células após o tratamento com DAAs são importantes questões a esclarecer para melhor compreender a evolução da doença [20, 22].

Por fim, diante da radical redução da prática da biópsia hepática após tratamento com DAAs, consideramos que os explantes hepáticos de pacientes com hepatite C crônica tratados com sucesso com DAAs sejam uma oportunidade para avaliar possíveis alterações histológicas com o tratamento antiviral. No presente estudo, adicionamos, até onde sabemos de modo pioneiro nas hepatites C, a análise de aspectos relacionados à ativação de CPH, através da semiquantificação do grau de CPI, EDI e RD por detecção imuno-histoquímica do CK7. Buscamos, ainda, relacionar tais alterações histológicas à análise imuno-histoquímica das células da resposta imune adaptativa do microambiente hepático e das implicações do tratamento sobre o estado de ativação ou exaustão dessas células, com a possível expressão de PD-1 e de FOX-P3.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Hepatite C

A hepatite C é uma doença causada através da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), seja ela aguda ou crônica. No caso das infecções agudas, geralmente os pacientes são assintomáticos e não apresentam risco de vida. Estima-se que cerca de 30% dos infectados eliminem o vírus espontaneamente por volta de 6 meses após a infecção, sem qualquer tratamento. No entanto, os demais 70% acabam por desenvolver infecção crônica pelo vírus [23]. A forma crônica da doença ocorre em decorrência da superação das defesas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro pelo vírus [24-27].

Nesse contexto, a infecção crônica pelo HCV se tornou um problema de saúde pública, pois trata-se de uma doença hepática que pode resultar em cirrose e/ou em carcinoma hepatocelular (CHC), que hoje afeta cerca de 58 milhões de pessoas [23]. Além disso, também pode se tornar uma doença sistêmica com manifestações extra-hepáticas associadas a uma vasculite crioglobulinêmica ou inflamação crônica [28].

A hepatite C crônica, embora aparentemente silenciosa e na maior parte do tempo assintomática, está associada a diversas e sérias comorbidades, comprometendo a qualidade de vida do paciente [29]. O risco de descompensação hepática em um indivíduo cirrótico é de até 6% ao ano, e após um primeiro episódio de descompensação hepática, o risco de óbito nos 12 meses seguintes é de até 20%. As manifestações extra-hepáticas e os eventos imune ou inflamatórios relacionados ocorrem em até 75% dos indivíduos com infecção crônica [30].

A progressão da doença crônica é acelerada pelos seguintes fatores: idade mais avançada de infecção; sexo masculino; obesidade, alto consumo de álcool; coinfeção pelo HIV; e imunossupressão. O risco de desenvolver carcinoma hepatocelular em 5 anos varia de 1% nas pessoas sem fibrose hepática para até 13% naqueles com cirrose. Outros fatores, como coinfeção por HBV, diabetes, esteatose hepática, infecção por genótipo 3, consumo elevado de álcool, idade avançada, contagem baixa de plaquetas e possíveis fatores genéticos, também são considerados fatores de risco individual para desenvolver CHC.

Todavia, a infecção pelo HCV é a única infecção viral crônica curável, feita através da chamada resposta virológica sustentada, onde o RNA do vírus se torna indetectável 12 semanas após o término do tratamento. Quando isso ocorre, há uma redução significativa do risco de morbidade e mortalidade associadas a doenças hepáticas e extra manifestações hepáticas, que são principalmente reversíveis [28]. Desde a aprovação dos antivirais de ação direta (DAAs) em 2014, houve uma revolução no tratamento do HCV que permitiu curar quase todos os pacientes [31]. O HCV pode ser classificado em sete genótipos e 86 subtipos [32]. Esses diferentes genótipos resultam em um prognóstico diferencial da doença e podem influenciar a seleção da terapia antiviral a ser utilizada [33, 34].

Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou cerca de 399 mil mortes por hepatite C, e estabeleceu as hepatites virais como uma ameaça à saúde pública mundial [35]. Assim, considerando o relevante impacto global em termos de morbidade, mortalidade e custos econômicos relacionadas a hepatite viral, neste mesmo ano, a OMS adotou a primeira Estratégia Global do Setor de Saúde sobre Hepatite Viral, com intuito de reduzir em 90% as novas infecções e as mortes por hepatite viral em 65% até 2030. Além disso, visa aumentar os índices de tratamento em até 80% [35]. Neste relatório, a OMS também destaca o papel crítico da cobertura universal de saúde e estabelece metas alinhadas com as dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, como estabelecer políticas baseadas em evidências e dados para ação, além de medidas de prevenção da transmissão e aumento de serviços de triagem, cuidados e tratamento [35].

No Brasil, acredita-se que o maior desafio atual para o cumprimento das metas estabelecidas pela OMS para a eliminação da infecção esteja no diagnóstico precoce da doença. Entre 1999 e 2020, foram notificados 262.815 casos confirmados de infecção. Desde a incorporação dos DAAs ao Sistema Único de Saúde em 2015, mais de 130 mil brasileiros já se recuperaram da hepatite C após uso destas medicações. O total de pacientes que recebeu o medicamento representa apenas 23% da meta pretendida para a eliminação da infecção no país até 2030. Pode-se destacar ainda que cerca de 40% dos tratamentos realizados com DAAs ocorreu entre 2019 e 2020, evidenciando avanços das políticas de combate à hepatite C no país [36].

## 2.2 Histórico da hepatite C

Em meados do século XX, a hepatite pós-transfusional era um fenômeno relativamente frequente. Contudo, após a identificação do vírus da hepatite B (HBV) em 1965 e do vírus da hepatite A (HAV) em 1973, percebeu-se que muitos desses casos de hepatite não podiam ser atribuídos a nenhum desses agentes [37-40]. Em 1975, Feinstone e colaboradores demonstraram esse acontecimento em uma coorte de pacientes com hepatite pós-transfusional, utilizando ensaios sorológicos para excluir infecções por HAV, HBV, citomegalovírus e vírus Epstein-Barr [40].

No mesmo período, Alter e colaboradores demonstraram a existência de um vírus que foi denominado como hepatite não-A, não-B (NANBH), associado à hepatite pós-transusão e responsável por até 90% dos casos [41]. Quase 15 anos depois, em 1989, Houghton et al. isolaram o DNA complementar do sangue de uma pessoa infectada. Esse processo permitiu o isolamento do RNA viral, que foi então chamado de vírus da hepatite C (HCV). A partir de então, o sequenciamento viral foi realizado e essa conquista orientou todas as etapas posteriores na identificação dos elementos do vírus [42]. Já na década de 1990, a partir de uma versão editada do genoma do vírus, Rice estabeleceu um robusto sistema de replicação *in vitro*, firmando, assim, as bases para futuras análises genéticas e funcionais [43].

Desta forma, o esforço coletivo para a identificação do HCV transformou o diagnóstico e a prevenção de risco nosocomial ou comunitário da hepatite C, o que rendeu, em 2020, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina ao britânico Michael Houghton e aos americanos Harvey J Alter e Charles M Rice, pela descoberta do HCV [44].

## 2.3 O vírus da hepatite C (HCV)

O HCV é um pequeno vírus envelopado de RNA de fita simples, com 9,6 kb e polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*. Seu genoma codifica uma poliproteína única de 3000 aminoácidos, que se divide, através clivagem proteolítica, em proteínas estruturais (núcleo, E1 e E2) e não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) [45-47]. NS5B e NS3/4 destacam-se por serem as mais importantes para a replicação viral.

A proteína do Core é altamente conservada. Ela interage com o genoma do HCV para formar o nucleocapsídeo viral, circundado por uma membrana lipídica, chamada de envelope viral, na qual as glicoproteínas do envelope estão ancoradas. Possui afinidade de associação com o retículo endoplasmático, gotículas lipídicas, mitocôndrias e núcleo celular, possibilitando sua interação com diversas proteínas celulares e, conseqüentemente, permitindo alteração das funções da célula hospedeira como transcrição gênica, metabolismo de lipídios, apoptose e vias de sinalização [46, 48]. Entre as principais funções dessa proteína, estão o recrutamento de proteínas não estruturais para membranas associadas a gotículas lipídicas, responsáveis pelo acúmulo de gordura, além de participarem do tráfego de vesículas intracelulares [46].

As proteínas estruturais E1 e E2, glicoproteínas altamente glicosiladas, possuem alta variabilidade e são os alvos preferenciais dos anticorpos neutralizantes. Estas proteínas são necessárias para o correto dobramento das estruturas virais, desempenhando, assim, papel importante na entrada do vírus na célula hospedeira através do reconhecimento das proteínas e ligação aos receptores de membrana celular [46, 49].

Já as proteínas não estruturais possuem papel importante no processamento da poliproteína viral e na replicação do RNA. A maturação dessas proteínas ocorre mediante atividade de proteases virais. A proteína p7 se localiza na junção entre as proteínas não estruturais e estruturais. Ela pertence à família das viroporinas, possuindo dois domínios transmembranas incorporados à membrana do retículo endoplasmático. Essa estruturação forma poros hidrofóbicos com atividade de canal iônico, fundamentais para a produção de partículas infecciosas, atuando na montagem e liberação de novos vírions [48, 50].

A NS2 é uma proteína transmembrana hidrofóbica que se insere na membrana do retículo endoplasmático e é essencial para completar o ciclo de replicação viral [48, 51, 52]. Essa proteína interage com ela mesma, formando homodímeros, além de interagir com as demais proteínas não estruturais. Seu papel é fundamental na montagem de novas partículas infecciosas e uma de suas principais funções é a clivagem da junção NS2-NS3 por meio de atividade autocatalítica metalo-protease dependente, que é codificada pelas regiões NS2 e amino-terminal de NS3.

A NS3, por sua vez, apresenta atividade multifuncional. Sua porção amino-terminal apresenta atividade de serino-protease, responsável pelas clivagens da poliproteína entre as regiões NS3-NS4A, NS4A-4B, NS4B-5A e NS5A-5B. Sua porção carboxi-terminal possui atividade RNA helicase e de NTPase. Ela é indispensável para a replicação do RNA viral devido a sua ação inibidora de importantes vias da resposta celular inata do hospedeiro. Atualmente é considerada um dos alvos principais para o desenvolvimento dos DAAs [48].

A NS4A forma um complexo estável com NS3 e atua como cofator para sua atividade de proteinase (protease). A interação entre essas proteínas permite a ativação do sítio ativo NS3 e uma clivagem mais eficiente [53]. Além disso, a NS4A também é necessária para a fosforilação de NS5A, podendo interagir diretamente com ela [48, 54].

A NS4B é uma pequena proteína hidrofóbica com 4 domínios transmembrana que desempenha importante função no recrutamento de outras proteínas virais. Ela interage com NS4A e, portanto, indiretamente com NS3 e com a NS5A [48, 54]. A proteína NS4B induz mudanças morfológicas no retículo endoplasmático para a formação de um complexo de replicação no citoplasma celular. Esse complexo é conhecido como “*teia membranosa*”, e se constitui de pequenas vesículas embebidas em uma matriz membranosa intimamente associada ao retículo endoplasmático rugoso [48, 54].

Por sua vez, a proteína NS5A, também conhecida como complexo de replicação, é vital para o processo de replicação e para a montagem do virion. Trata-se de uma fosfoproteína hidrofílica que modula as vias de sinalização celular e resposta ao Interferon (IFN), justificando seu papel na replicação viral. Foi proposto que essa proteína possui interações com proteínas que afetam a sinalização celular, sendo capaz de regular mecanismos pró e antiapoptóticos. Além disso, ela pode modular vias envolvidas na sinalização mitogênica da célula hospedeira, que regulam o crescimento e a ativação. Também foi implicada sua interferência nas vias de sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase, que podem levar à transformação de hepatócitos e formação de HCC [46, 48, 54].

Por fim, a NS5B é uma proteína que atua como RNA polimerase dependente de RNA e desempenha um papel importante na síntese de novos genomas virais. A replicação procede via síntese de um RNA de fita negativa complementar que utiliza o genoma como modelo, e a síntese subsequente de RNA de fita positiva a partir deste RNA de fita negativa intermediário. Como componente central da replicase do HCV, a NS5B emergiu como um alvo principal para intervenção antiviral [55].

## 2.4 Epidemiologia

As hepatites virais aparecem como a principal causa mundial de mortalidade infecciosa, apesar da prevalência viral ter diminuído de cerca de 170 milhões de portadores crônicos em todo o mundo, de acordo com relatos prévios [56], para cerca de 71 milhões em 2017 [35, 57], e atualmente para 58 milhões de pessoas, com cerca de 1,5 milhões de novas infecções ao ano [23].

Estimativas com base em dados de 2015 mostram cerca de 71,1 milhões de indivíduos virêmicos no mundo, correspondendo a uma prevalência global de cerca de 1%, com mais de 1.750.000 casos de novas infecções ao ano. A prevalência de viremia reportada em 2017 pelo *Polaris Observatory* foi de 0,9%, e a população infectada foi estimada em aproximadamente 71 milhões. Os genótipos mais frequentemente observados foram 1b, 1a e 3, contabilizando respectivamente 33,4%, 31% e 30,2%, das infecções [57].

Comparado a análises prévias [58], ocorreu uma diminuição da estimativa global de infecções e supõe-se que a redução na prevalência esteja associada à diminuição de infecções nosocomiais e melhor acesso aos antivirais [35]. Também se acredita que a redução na prevalência seja devida às estimativas menores de prevalência na China e África, à maior mortalidade por causas relacionadas ao fígado e ao envelhecimento da população [57].

De acordo com a OMS, o HCV ocorre em todo globo. Entretanto, a prevalência não é homogênea entre as diferentes regiões. A Região Mediterrânea Oriental é a área com maior número de indivíduos infectados (cerca de 15 milhões), seguido pelas Regiões Europeia e do Pacífico Ocidental (14 milhões cada), e pela Africana (10 milhões). Cerca de 80% das infecções globais por HCV ocorreram em 31 países, e seis deles (China, Paquistão, Nigéria, Egito, Índia e Rússia) contabilizam mais de 50% dos casos de infecção. Curiosamente, metade dos países que respondem por 80% das infecções do mundo estão em grupos de média e baixa renda (**Figura 1**). Importante ressaltar que, em muitos países, os dados de prevalência possuem baixa qualidade e necessitam constantes revisões [57].

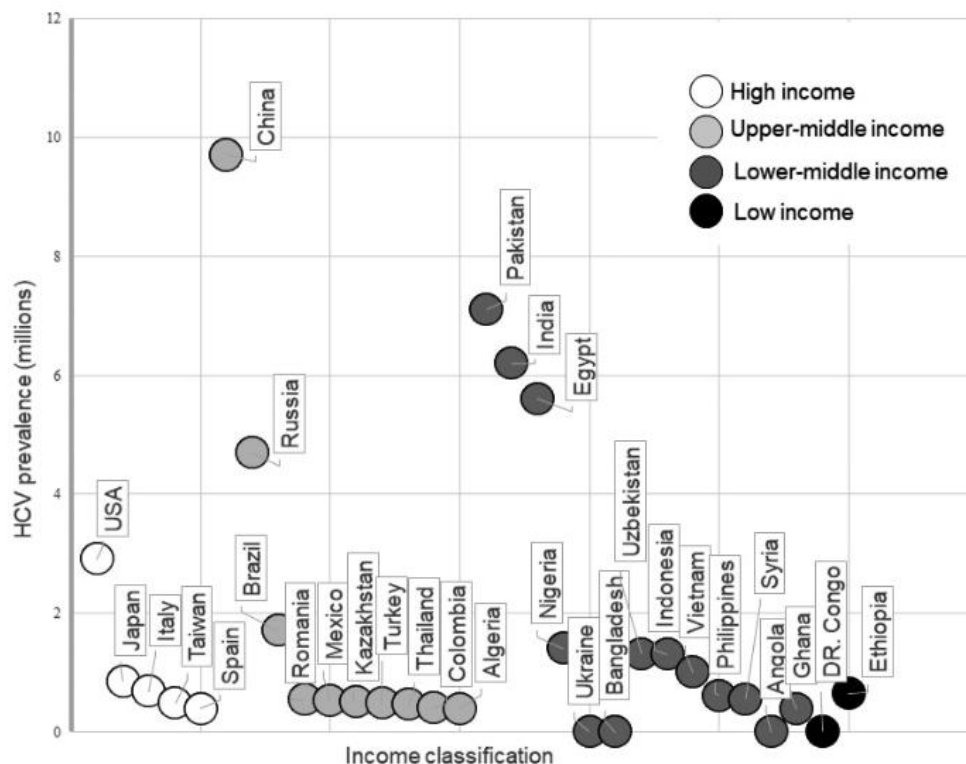


Figura 1. Relação entre prevalência do HCV e classificação de renda. Maior prevalência em países de renda mais baixa. Fonte: Lombardi et al., 2019 [59].

Em 2015 a incidência global do HCV foi estimada em cerca de 1,75 milhões de novas infecções (cerca de 23,7 casos por 100.000), havendo maior incidência da hepatite C em Regiões Europeias e Mediterrânea Oriental. Foi reportada na Região Europeia uma incidência de 61,8 casos por 100.000 indivíduos versus 62,5 casos por 100.000 indivíduos na Região Mediterrânea Oriental. As regiões da Ásia Central e Europa Leste apresentaram as maiores estimativas regionais para a prevalência do vírus [23]. A mortalidade global atribuível à hepatite viral em 2015 foi de aproximadamente 720.000 mortes por cirrose e 470.000 mortes por CHC [35].

Ademais, observou-se na população global uma distribuição etária bimodal da infecção, refletindo maior prevalência entre indivíduos acima de 50 anos e mais jovens, com idade entre 20 e 40 anos, entre os quais a injeção de opioides tem sido a via predominante de novas infecções. Uma revisão sistemática e metanálise, realizada entre 2002 e 2015, notou prevalência do HCV consistentemente maior entre indivíduos infectados pelo HIV, especialmente entre usuários de drogas injetáveis [60]. Sendo reportados cerca de 2 a 3 milhões de casos de coinfeção com HCV e HIV, e a prevalência foi notavelmente maior entre homens homossexuais [61].

## 2.5 Epidemiologia no Brasil

O Brasil é um país de tamanho continental dividido em cinco macrorregiões e estima-se que cerca de 657 mil pessoas tenham infecção ativa por HCV e a maior prevalência da doença esteja entre indivíduos com idade superior a 40 anos. Considerando-se adultos acima de 18 anos, ocorre considerável variação da prevalência da infecção entre as diferentes macrorregiões do país. Na Região Norte, a prevalência é de cerca de 3,2%, no Centro-Oeste e Sul, de 1,9%, no Sudeste, de 1,8%, e no Nordeste, de 1,6% [62].

Entre 2009 e 2018, 195.039 casos de hepatite C foram reportados no Brasil. Nesta análise de distribuição de casos por região, 50,65%, 32,18%, 8,19%, 4,59% e 4,39% ocorreram nas regiões Sudeste, Sul, Nordeste, Norte e Centro-Oeste, respectivamente. Em 2018 os estados com mais casos confirmados de hepatite C foram São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, com 35%, 20,6% e 8,8%, respectivamente. Considerando apenas os casos confirmados da doença, 57% ocorreram em homens e 43% em mulheres. Havendo maior ocorrência de casos entre indivíduos acima de 40 anos, sendo essa tendência observada em ambos os gêneros [63].

Em 2020, dados do Boletim Epidemiológico Nacional descrevem que no Brasil ocorreu uma elevação a partir de 2015 das taxas de detecção de casos confirmados de hepatite C, quando, para fins de vigilância epidemiológica, foi estipulado que qualquer caso com um dos marcadores anti-HCV ou HCV-RNA reagentes passariam a ser notificados.

Na análise da distribuição de casos por marcadores sorológicos, a partir de 2015, ano em que mudou a definição de caso, verificou-se que a proporção de casos com os dois marcadores anti-HCV e HCV-RNA reagentes apresentou queda (passando de 50,4% em 2015 para 36,3% em 2020), enquanto os casos notificados com apenas a informação do anti-HCV apresentou elevação (passando de 34,5% em 2015 para 48% em 2020); e os casos notificados com anti-HCV reagente e HCV-RNA não reagente permaneceram em torno de 12% nesse período [36]. Ainda em 2020, a maior taxa de infecção observada foi na região Sul (com 12,1 casos para cada 100 mil habitantes), seguida pelo Sudeste (4,5), Centro-Oeste (3,0), Norte (2,6) e Nordeste (1,1) [36].



A principal forma clínica dos casos de HCV notificada nacionalmente foi a crônica, independente da faixa etária. Dentre os 262.815 casos confirmados de HCV no país desde 1999, 151.312 (57,6%) ocorreram em indivíduos do sexo masculino e 111.398 (42,4%) do sexo feminino. Sendo observada estabilidade na razão de sexos desde 2010, com média de 13 casos em homens para dez casos em mulheres em 2020. Ao longo dos anos, a variável etnia foi mais bem relatada, com proporção de 78,1% de registros destas informações em 1999, atingindo 89,3% em 2020. Ainda em 2020, entre os casos que incluíram a informação referente à etnia, 55,3% foram referidos como brancos, 33,3% como pardos, 10,2% como pretos, 0,9% como amarelos e 0,3% como indígenas [36].

Quanto à provável fonte ou mecanismo de infecção no país, destaca-se a falta de informação em 56,9% dos casos notificados no período de 2010 a 2020, o que dificulta a análise sobre as prováveis fontes de infecção. Em todo período, observa-se que a mais provável fonte de infecção foi o uso de drogas, correspondendo a 11,9% do total dos casos, seguido da transfusão sanguínea (10,0%) e da relação sexual (9,0%). Ressalta-se que, em 2020, a proporção de infecções por via sexual (9,6%) foi superior ao percentual de infecções relacionadas ao uso de drogas (7,4%), e a proporção de infecções por via transfusional apresentou-se bastante reduzida (3,2%) [36].

## 2.6 Genótipos

O sequenciamento do genoma seguido de análise filogenética permite a caracterização e classificação dos patógenos virais baseado em seu perfil genético. Os patógenos virais geralmente são subdivididos em genótipos ou tipos, com semelhanças genéticas que variam entre 66% e 69%; subgenótipos ou subtipos, com semelhanças variando entre 77% e 80%, e há as quasispécies virais, com similaridades entre 91 até 99%. As quasispécies são formadas por sequências em minoria dentro de uma população dominante, que se caracterizam por uma distribuição bem definida de mutantes que foram gerados por um processo de mutação-seleção. Acredita-se que seja possível que o patógeno viral emergente evolua geneticamente no hospedeiro, originando a quasispécie, e assim diversos novos patógenos virais podem determinar o perfil genético do vírus em determinada população ou região geográfica. Portanto, o desenvolvimento de quasispécies apresenta desafios a vigilância imune do hospedeiro, terapias antivirais e ao desenvolvimento eficaz de vacinas [32]. Também é possível que diversos tipos ou subtipos virais, como entidades biológicas distintas, possam causar diferentes patogenicidade, transmissibilidade ou apresentar resposta distinta ao tratamento antiviral [63].

Até o momento, há oito genótipos do HCV confirmados no mundo e 86 subtipos reportados. Os diferentes genótipos, foram nomeados de 1 a 8 por ordem de sua descoberta, e diferem uns dos outros em cerca de 30-35% em sua sequência nucleotídica. Os genótipos são divididos em subtipos, definidos por letras, que diferem entre si cerca de 20-25% em sua sequência nucleotídica, e considera-se que, ainda que isolados dentro do mesmo subtipo, possam diferir em 10% [32]. A prevalência e distribuição dos diferentes genótipos e subtipos variam de acordo com a área geográfica (**Figura 2**). Em todo o mundo, os genótipos mais prevalentes são os genótipos 1 e 3, compreendendo, respectivamente, 44% e 25% das infecções pelo HCV [32].

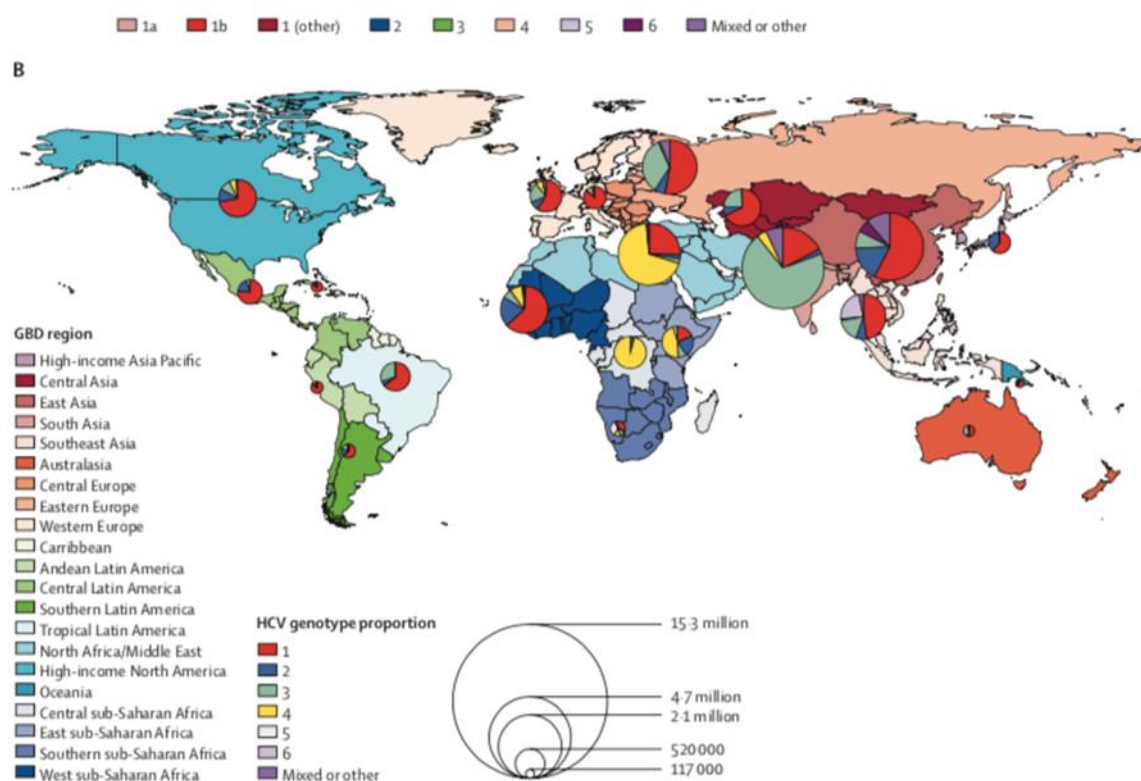


Figura 2. Proporção genótipo e número total de infecções (representadas pelo tamanho do círculo) nas regiões por carga global da doença (GBD). Fonte: Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017 [57].

O genótipo 1 é o mais prevalente no mundo. O subtipo 1a exibe maior prevalência nos Estados Unidos e Canadá, e o subtipo 1b maior prevalência na Europa. As infecções por genótipo 3 são mais comuns em países de renda média e baixa. O genótipo 3 é endêmico do Sudeste Asiático e cerca de 75% das infecções por esse genótipo ocorrem no sul da Ásia. As infecções por genótipo 4 constituem 15% de todas as infecções, sendo mais frequentes no Oriente Médio, Egito e África Central e Norte. O genótipo 2 predomina na África Ocidental, e os genótipos 2 e 6 ocorrem no Leste Asiático. Menos

de 1% das infecções globais são por genótipos 5, 7, e 8, e a maior parte dos casos são originários da África Subsaariana Meridional e Central. O genótipo 5 ocorre quase exclusivamente na África do Sul, enquanto o genótipo 6 é predominantemente distribuído em toda a Ásia. O genótipo 7 foi identificado em sete indivíduos infectados na República Democrática do Congo, e o genótipo 8 foi encontrado em quatro indivíduos infectados de Punjab (Índia) [64, 65].

Um estudo baseado no levantamento de determinação do genótipo do programa do Ministério da Saúde, analisou amostras das macrorregiões do Brasil de quase 30.000 indivíduos com diagnóstico recente de infecção pelo HCV entre 2016 e 2018. Foi relatado maior prevalência do G1A com 40,9%, seguido pelo G1B e G3, com 30,2% e 23,8% respectivamente, sendo a prevalência de outros genótipos menor que 4%. A idade mediana para os homens foi de 54 anos, e para as mulheres de 57 anos. O G1A foi mais prevalente nas macrorregiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, enquanto o G1B foi mais prevalente no Norte e Nordeste. Na região Sul foi notado maior prevalência do G3 com relação ao G1B, contrastando com o descrito anteriormente no Brasil [63].

Em 2020, Nutini e colaboradores [63] relataram a prevalência da infecção entre as diferentes regiões do país, variando entre 3,2% no Norte, a 1,9 % no Centro e Sul, 1,8 % no Sudeste e 1,6 % no Nordeste. A maioria das infecções foram por genótipo 1A (G1A), contabilizando 40,9% das infecções, genótipo 1B (G1B), com 30,2%, e genótipo 3 (G3), com 23,8%. Tais dados são similares à estimativa prévia publicada por Messina e colaboradores [64], em 2015, que descreveu o genótipo 1 com 69,3% e o genótipo 3 com 26,9% das infecções. A maior prevalência de G1A foi entre indivíduos homens (44,4%) comparativamente a mulheres (35,8%), e o G3 foi mais prevalente na região Sul. Foi observado alta prevalência de coinfeção com HIV entre indivíduos infectados com HCV com diagnóstico recente, sendo a prevalência de coinfeção de 15%. Esta foi mais alta entre os homens (18,1%) em comparação com as mulheres (10,4%). A prevalência entre indivíduos coinfectados com HCV / HIV e indivíduos monoinfectados com HCV foram respectivamente: G1A 60,6% versus 37,8%, G1B 15,2% versus 32,9% e G3 18,9% versus 24,7% [63].

A idade mediana entre os indivíduos com G1A e G3 foi inferior ao G1B e G2, sugerindo que os genótipos G1A e G3 estão se expandindo na população brasileira. Curiosamente, houve maior prevalência destes genótipos nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, em comparação com a maior prevalência de G1B nas regiões Norte e Nordeste. Com base nesses resultados, especula-se que a epidemia de HCV está se

expandindo nas regiões Sul do país, e destaca-se a alta prevalência do G3 observado entre as mulheres infectadas pelo HCV nessa região brasileira. A prevalência de genótipos distintos no Brasil sugere o estabelecimento e expansão de cepas consideradas, no passado recente, como cepas minoritárias no país. Observou-se também que a idade mediana entre os indivíduos coinfectados pelo HCV/HIV foi menor do que entre os indivíduos monoinfectados pelo HCV, o que também sugere uma epidemia crescente entre os indivíduos infectados pelo HIV [58].

## 2.7 Tratamento

O conhecimento do curso natural da infecção é considerado a pedra angular de qualquer avaliação da necessidade de terapia e justifica os altos custos do tratamento antiviral. A necessidade de tratar não se refere somente à progressão da hepatite C crônica para cirrose, mas sobre uma possível modificação do curso natural da doença, inclusive nos casos com cirrose identificada. Deve ser destacado que o tratamento antiviral que leva à resposta virológica sustentada (RVS) em pacientes com cirrose estabelecida pode não só prevenir complicações, mas também contribuir para a regressão da fibrose [66].

O principal objetivo do tratamento é atingir RVS, indicando a cura virológica da infecção [67, 68]. A RVS é definida pela não detectabilidade do HCV-RNA da 12<sup>a</sup> à 24<sup>a</sup> semana após o término da terapia, feita através de ensaio molecular sensível que possua um limite inferior aceitável de quantificação [69].

Atingir RVS se relaciona a melhor qualidade de vida, com redução em cerca de 70% do risco de CHC e 90% do risco de mortalidade relacionada ao fígado [70, 71]. Além disso, na era da terapia com DAAs, atingir RVS se relacionou à redução em cerca de 30% da lista de transplante hepático por cirrose descompensada [72]. O tratamento também é indicado para evitar a progressão da doença e eventos relacionados, melhorando a qualidade e expectativa de vida e reduzindo a transmissão da infecção [73, 74].

Uma questão relevante no tratamento da HCV crônica é a relação custo-efetividade, devido principalmente ao alto custo da terapia antiviral a saúde pública [75]. O estudo de Smith-Palmer e colaboradores, por exemplo, demonstrou que nos primeiros cinco anos após o tratamento, os custos médicos com pacientes que alcançarem RVS foram 13 vezes menores se comparados aos pacientes com infecção ativa [76].

As opções terapêuticas tiveram evolução significativa nos últimos anos. Por mais de duas décadas, o IFN foi a base para o tratamento do HCV. As respostas ao tratamento evoluíram em 1998 pela adição de ribavirina e após, entre 2001 e 2002, pela ligação da molécula de IFN ao polietilenoglicol. A combinação de interferon peguilado associado a ribavirina (PEG-IFN e RBV), por anos esteve associado à cura sub ótima e alta toxicidade relacionada ao tratamento via oral [46]. Adquirir RVS durante o tratamento com IFN e RBV foi relacionado à diminuição da inflamação hepática, regressão da fibrose na maioria dos casos e reversão da cirrose em quase metade deles. Além disso, a aquisição de RVS foi considerado um fator independente associado a ausência de significativa fibrose [77].

Ao longo dos anos, a melhor compreensão do ciclo de replicação do HCV levou à identificação de novos alvos terapêuticos. Em 2011 foram aprovados os primeiros agentes antivirais de ação direta (DAAs), boceprevir e telaprevir, para tratamento do genótipo 1, combinados com a terapia dupla tradicional [78]. Com isso, ocorreu um aumento das taxas de RVS tanto em pacientes virgens de tratamento quanto naqueles que estavam repetindo o tratamento, porém com maior toxicidade, interações e custos. Além da menor segurança em pacientes com doença avançada, isso pode desencadear descompensação ou até óbito [79].

Desde 2013, a incorporação dos novos DAAs, com melhor eficácia, propriedades pan-genotípicas, perfil de tolerabilidade favorável e com taxas de RVS acima de 95% [73] repercutiu em grande avanço no tratamento da HCV crônica. Assim, a aplicabilidade dos DAAs se tornou possível em praticamente todos os indivíduos infectados [80], demonstrando alta potência associado a menor toxicidade e maior barreira à resistência, com tratamentos curtos e todos com regime por via oral. A RVS com o tratamento com DAA se correlacionou à diminuição significativa do risco de morbidade relacionada ao fígado e todas as causas de mortalidade [81].

Em 2019 um grande estudo prospectivo com 10.166 pacientes demonstrou que o tratamento com DAAs se associa a redução do risco de mortalidade [82]. Outro estudo de 2017 reportou associações similares, que demonstrou significativa diminuição em todas as causas de mortalidade naqueles que receberam DAAs, destacando que idade, cirrose e comorbidades, como o diabetes, se correlacionam positivamente com a mortalidade [83].

A recomendação atual é de o tratamento deve ser oferecido a todos os pacientes com diagnóstico de infecção pelo HCV, nas suas formas aguda ou crônica, independentemente do estágio de fibrose hepática [34, 84]. Os regimes atuais de tratamento padrão com DAAs são apropriados tanto para indivíduos sem experiência de tratamento quanto para indivíduos já tratados. O genótipo, associado ao histórico de tratamento e à gravidade da doença hepática determinam o esquema ideal da terapia. A opção primária é a utilização de DAA sem IFN, e a RBV deve ser omitida sempre que possível.

Pessoas com expectativa de vida de um ano ou menos e aqueles cuja doença não é remediável por terapia com DAAs ou por transplante de fígado constituem as únicas exceções a essa recomendação. O tratamento deve ser acelerado naqueles com fibrose substancial ou cirrose, nas populações consideradas de alto risco, naqueles com manifestações extra-hepáticas e nos receptores de explantes hepáticos. Mulheres em idade fértil que estão tentando engravidar e pacientes em hemodiálise devem ter acesso ao tratamento como prioridade.

### *2.7.1 Mecanismos de ação dos DAAs*

Todos os DAAs atuam diretamente no HCV, interrompendo a sua replicação [34, 84]. Os DAAs têm como alvo a protease NS3/4A, a replicase NS5A, a porção de montagem e a polimerase dependente de RNA NS5B [22]. As limitações iniciais dos inibidores de protease NS3 de primeira geração têm sido superadas por inibidores de protease pangênótipica de segunda e terceira geração. Os inibidores NS5A são potentes inibidores da replicação do vírus; no entanto, podem selecionar variantes de resistência. Os inibidores da polimerase NS5B incluem o sufixo -buvir, e duas classes desses inibidores foram desenvolvidas: um inibidor alostérico não nucleosídeo que se liga à enzima para bloquear sua atividade catalítica, e o nucleotídeo sofosbuvir, um finalizador de cadeia análogo de nucleosídeo que confere uma alta barreira à resistência [85].

Diante das diversas opções de DAAs e de regimes de tratamento, dosagens e formulações, o esquema escolhido depende do custo e acessibilidade das medicações. Fatores de base como genótipo, histórico de tratamento, estágio de fibrose e associação com variantes pré-existentes resistentes são considerados. A combinação de duas ou três drogas, por exemplo tendo como alvo os inibidores de protease NS3/4, inibidores da polimerase NS5B e inibidores do complexo de replicação NS5A, apresentam eficácia pan-genotípica com índices de RVS acima de 95% e ampla tolerabilidade [86, 87].

Na Europa e Estados Unidos, os DAAs ficaram disponíveis desde 2013 e já há pesquisas clínicas mostrando bons resultados. Um exemplo particularmente bom é o campo de transplante, em que ocorreu diminuição de casos de cirrose descompensada listados para transplante hepático. Na Itália, uma avaliação de 1.109 pacientes que aguardavam por transplante antes e depois da introdução do DAAs revelou uma diminuição significativa da cirrose relacionada ao HCV, especialmente para formas descompensadas (de 24,2% para 15,9%) [88]. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo espanhol com 2.379 pacientes que aguardavam por transplante hepático por doença hepática descompensada, com uma diminuição significativa ao longo do tempo com o uso em larga escala de DAAs [89]. Mais recentemente, um estudo multicêntrico, que incluiu vários países europeus e os Estados Unidos, registrou 60.527 casos de transplante de fígado. Os autores observaram, além de um declínio na listagem de pacientes com cirrose descompensada por HCV, melhora na sobrevida nos últimos três anos pós-transplante para estes pacientes devido ao impacto dos DAAs [90].

### *2.7.2 Diretrizes do tratamento no Brasil*

No Brasil, todos os cidadãos acima de 18 anos possuem direito ao tratamento. O tratamento da HCV está indicado para todos os pacientes com diagnóstico de infecção, nas suas formas aguda ou crônica, independentemente do estágio de fibrose hepática [74].

A partir de 2015, o Ministério da Saúde incorporou os primeiros DAAs para o tratamento da HCV, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Os esquemas de tratamento preconizados pelas diretrizes nacionais variam de acordo com o genótipo ou subgenótipo, estágio de fibrose e histórico de tratamento [74].

### *2.7.3 Novas questões a serem consideradas e o desenvolvimento da vacina*

Embora as novas estratégias de tratamento com o uso de DAAs estejam repercutindo em excelentes resultados, custo, eficácia e controle da infecção, novas questões devem ser consideradas.

A reinfeção após o sucesso do tratamento é um importante problema de saúde pública, podendo impactar os esforços para controlar a transmissão. Como esses grupos geralmente não eram tratados na era do *pgIFN*, as taxas de reinfeção eram quase nulas e raramente descritas. Um estudo recente com 4.114 indivíduos, relatou a reinfeção em 5,7% entre usuários de drogas injetáveis e 10,2% entre indivíduos com coinfeção pelo

HCV-HIV [91]. Outra questão seria a possibilidade de desenvolvimento de cepas mutantes em pacientes que não atingem SVR [92]. Felizmente, dados recentes de ensaios clínicos mostraram que a maioria dos pacientes que falham no tratamento com DAAs têm excelentes opções de retratamento com terapias de resgate recém-aprovadas [93].

Apesar das altas taxas de RVS com o tratamento com DAAs, o acompanhamento dos pacientes tratados é obrigatório, devido à possibilidade de progressão da doença, complicações da cirrose e, também, ao possível aparecimento de CHC [94].

Assim, embora os DAAs venham se mostrando altamente eficazes, é improvável que a eliminação do HCV seja alcançada apenas com o tratamento, e a vacina continua sendo essencial para prevenir a transmissão e reinfecção em grupos de risco. O desenvolvimento da vacina contra o HCV continua desafiador devido à diversidade genética complexa do vírus, o efeito da polimerase viral propensa a erros em produzir diferentes quasispecies e uma compreensão inadequada dos mecanismos de escape imunológico viral [59, 95]. Epítomos virais altamente conservados são os alvos usuais do desenvolvimento de vacinas baseadas em anticorpos. Os anticorpos neutralizantes contra o vírus são direcionados contra a região hiper variável 1 da proteína E2. Entretanto, a heterogeneidade dessa região dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Contudo, a indução de anticorpos neutralizantes cruzados é alcançável. Sendo assim, diversas novas vacinas contra o HCV estão em desenvolvimento [96].

## 2.8 Importância da avaliação histológica

Múltiplas terminologias e sistemas de classificação e estadiamento foram estabelecidos nos últimos 60 anos. A abordagem evoluiu com uma melhor compreensão da etiologia e curso natural das hepatites crônicas e a disponibilidade e necessidade de avaliar novas opções de tratamento. As primeiras classificações descritivas enfatizavam o padrão de lesão necroinflamatória como categorias prognósticas, levando ao uso de terminologias como “crônica persistente”, “crônica agressiva”, “crônica ativa” e “hepatite lobular crônica”. Em 1981, Knodell e colaboradores [97] propuseram um sistema de pontuação detalhado, cuja principal desvantagem era combinar a pontuação para atividade e fibrose. Posteriormente, em 1995, Ishak e colaboradores [98] propuseram uma modificação desse sistema e, atualmente, é bastante popular, especialmente no cenário de estudos clinicopatológicos.



Na década de 1990, foram propostos sistemas mais concisos e mais fáceis de usar para relatórios clínicos. A criação desses novos sistemas foi liderada pelo sistema Scheuer (1991) e seguido pelo sistema da Associação Internacional para o Estudo do Fígado (IASL) (1994), sistema Batts e Ludwig (1995) e metanálise de dados histológicos em hepatite viral (METAVIR) (1996) [99-102]. Todos os sistemas de classificação incluem avaliação morfológica para inflamação e necrose hepatocelular. A extensão e a distribuição desses processos formam a base da classificação. Todos os sistemas de estadiamento são baseados na quantificação da extensão da fibrose que segue a lesão necroinflamatória persistente.

### *2.8.1 O estudo Anátomo-Patológico na Hepatite Crônica*

O entendimento das Hepatites Crônicas como infecções por vírus hepatotrópicos, com acometimento do parênquima hepático, resultando em doença hepática crônica, demonstra a importância fundamental do reconhecimento das alterações histológicas associadas aos indicadores histológicos de progressão da doença. De acordo com a história natural da infecção pelo HCV, no geral, a avaliação histológica é uma representação do processo necroinflamatório parenquimatoso em andamento e permite a observação de um amplo espectro de achados histológicos de acordo da fase da infecção [103].

Historicamente, as terminologias utilizadas para descrever as hepatites virais crônicas incluem “hepatite crônica persistente”, “hepatite crônica ativa” e “hepatite lobular crônica” [104]. O termo “hepatite crônica persistente” era utilizado para descrever apenas inflamação portal, “hepatite crônica ativa” se referia à inflamação portal associado à necrose piecemeal, e a designação de “hepatite lobular crônica” era utilizada na presença de necroinflamação lobular sem necrose piecemeal significativa [105]. No período em que essa classificação foi estabelecida, os testes sorológicos para hepatite ainda não haviam sido desenvolvidos e a infecção ainda era referida como hepatite não A-não B. Contudo, esses termos apresentavam certo valor prognóstico, sendo a “hepatite crônica persistente” considerada uma infecção autolimitada; enquanto a “hepatite crônica ativa” e a “hepatite crônica lobular” designavam uma infecção com potencial de evolução para hepatopatia crônica, caso não fosse tratado. Posteriormente, com a melhor compreensão biológica da infecção, as limitações destas classificações foram reconhecidas e estes termos se tornaram obsoletos. Finalmente, tornou-se evidente que em todas as categorias de hepatite descritas acima havia a progressão para doença hepática crônica, fibrose e finalmente cirrose [106, 107].

### 2.8.1.1 A avaliação histológica no estadiamento das hepatites crônicas

O estudo histológico na avaliação diagnóstica das hepatites crônicas representa um importante determinante do grau da necroinflamação, além de ter implicações prognósticas e terapêuticas ao contribuir para a avaliação da progressão da doença e na determinação da resposta ao tratamento antiviral.

Ao longo da história, diversos sistemas de estadiamento foram desenvolvidos com a intenção de avaliar objetivamente os achados histológicos. O primeiro sistema de pontuação foi proposto em 1981 por Knodell e colaboradores [97]. Posteriormente foram propostos os sistemas de pontuação de Batts e Ludwig [101], Scheuer [99], Ishak (Knodell modificado) [98] e METAVIR [102]. Considerando-se que o dano na hepatite crônica é um processo biológico complexo, todos os sistemas de classificação apresentam desvantagens e suscetibilidade a amostragem e variabilidade do observador, entretanto são considerados sistemas reprodutíveis.

A classificação do subtipo de cirrose foi proposta pela *Laennec Liver Society* em 2012 [108]. De acordo com este sistema de classificação, há três categorias com base na largura dos septos fibrosos e no tamanho dos nódulos, sendo classificados da seguinte forma: A – cirrose leve, ou seja, grandes nódulos cirróticos circundados por septos fibrosos finos; B – cirrose moderada, ou seja, nódulos cirróticos circundados por septos fibrosos largos; e C – cirrose grave, ou seja, pelo menos um septo muito largo ou muitos micronódulos. Essa classificação se trata de uma modificação da categoria de cirrose METAVIR (F4), sendo desenvolvida com o intuito de contribuir com fatores prognósticos que podem prever o desenvolvimento de eventos e mortalidade relacionados ao fígado, como descompensação hepática e CHC [108].

No geral, a graduação histológica da atividade nas hepatites crônicas se baseia na semiquantificação da hepatite de interface e necroinflamação lobular. A hepatite de interface é graduada de acordo com a quantidade e extensão do envolvimento portal. A inflamação lobular é graduada de acordo com o número de focos e presença de necrose em ponte ou confluyente. O estágio da doença é avaliado semiquantitativamente em uma escala de 0 a 4 ou 0 a 6, de acordo com a fibrose portal, extensão do septo fibroso e fibrose em ponte com distorção arquitetural e cirrose [103].

No Brasil, a classificação de Alves e Gayotto [109], de 1995, teve como objetivo avaliar as alterações arquiteturais e o grau de atividade de forma individualizada. Foi proposta a valorização de cada achado histológico, através da semiquantificação realizada separadamente nos diferentes compartimentos, como espaço porta; interface, espaço porta e parênquima; e lóbulo. Nessa classificação, cada uma das variáveis com relação a alteração arquitetural e a atividade necroinflamatória são semiquantificados como 0 = ausente a 4 = grau máximo.

A avaliação histológica na hepatite C crônica representa diversas características que correspondem à evolução e progressão da infecção. A resposta tecidual ao tratamento com DAAs geralmente é favorável, com RVS em mais de 90% dos pacientes [110]. Entretanto, a inflamação persistente de alto grau é observada em um subgrupo de pacientes [6]. Portanto estudos se tornam necessários para identificar parâmetros que possam prever resposta histológica ao tratamento com DAAs.

#### *2.8.1.2 Os diferentes achados histológicos*

A definição clínica da HCV crônica é ter no mínimo seis meses de infecção persistente, a partir do início da infecção [111]. Os achados histológicos que definem a hepatite viral crônica têm sido historicamente bem caracterizados e, embora não sejam específicos, correspondem à necroinflamação acompanhado por diferentes graus de fibrose [112].

A inflamação portal é um achado característico da hepatite crônica, associada ou não à inflamação lobular, consistindo predominantemente por infiltrado linfoplasmocítico de intensidade variada. O infiltrado inflamatório portal pode permanecer confinado ao espaço porta ou envolver o parênquima adjacente, configurando assim a hepatite de interface [113].

A hepatite de interface (formalmente denominado necrose piecmeal) é uma lesão frequente na hepatite crônica e se caracteriza pelo extravasamento do infiltrado linfoplasmocítico para os hepatócitos periportais através da interface espaço porta-parênquima. Esse achado se associa com frequência ao dano hepatocitário e apoptose [114, 115].

A inflamação lobular é outro componente da atividade necroinflamatória que pode ser observado. Ela se manifesta como hepatócitos apoptóticos isolados, necrose focal de hepatócitos, ou até necrose em ponte ou confluyente [116].

A tríade de inflamação portal nodular linfocitária, danos a ductos biliares e esteatose são considerados achados altamente característicos da HCV crônica [117]. Agregados linfoides portais em proximidade ao ducto biliar podem se associar ao dano discreto não destrutivo do epitélio biliar, conforme originalmente descrito por Poulsen e Christoffersen [118], e trata-se de um achado que pode ser observado, embora não seja específico da hepatite crônica. As lesões biliares foram reportadas em até 91% dos casos na série em acordo com Bach e colaboradores [116], sendo mais prevalentes nas infecções por genótipo 3a [119].

A fibrose é considerada um processo reparador dinâmico, consequente da inflamação crônica e da perda e regeneração hepatocitária. Nas hepatites crônicas, ela geralmente se inicia nos espaços porta, resultando em expansão, podendo evoluir para septos fibrosos finos e fibrose em ponte. Com a progressão da doença hepática crônica, o processo evolui e, associado a regeneração hepatocitária, leva à distorção arquitetural com formação de nódulos e eventual cirrose. O acúmulo do colágeno que resulta em fibrose é rotineiramente avaliado pelas colorações de tricrômica de Masson e reticulina [120].

Historicamente a fibrose tem sido considerada como um processo irreversível. Entretanto, há relatos sobre a diminuição nos escores de fibrose após o tratamento do processo etiológico em diversas doenças, inclusive na hepatite viral crônica [121]. No contexto do tratamento com IFN, a reversão da fibrose foi documentada em pacientes infectados pelo HCV [122]. Em 2015, Haseltine e colaboradores [123] descreveram a regressão da fibrose com o tratamento antiviral e erradicação viral sustentada no tecido hepático de pacientes com HCV crônica. Embora a regressão da fibrose seja documentada, é limitada à diminuição ou desaparecimento dos septos fibrosos na avaliação histológica, e foi demonstrado que as sequelas da cirrose ainda podem persistir.

Por fim, a esteatose, frequentemente do tipo macrovesicular, é considerada um efeito citopático viral [124] e, quando presente, constitui uma característica da HCV crônica. Esse achado foi descrito como comumente observado em associação ao genótipo 3a [119]. A esteatose nesse cenário é geralmente discreta e com distribuição periportal ou azonal. A presença de esteatose é presumida como secundária à peroxidação mediada por radicais livres, que é desencadeada pelo aumento do armazenamento de ferro induzido pelo vírus [125].

## 2.9 Citoqueratina 7 (CK7)

O estudo da expressão das citoqueratinas (CK) no tecido hepático, em especial a citoqueratina 7 (CK7), promove importante contribuição sobre a microanatomia hepática biliar, e sobre os mecanismos subjacentes à atividade das células progenitoras hepáticas (CPH) e regeneração tecidual. A CK7 é expressa por ductos biliares normais, além de destacar a reação ductular (RD) que ocorre em muitas doenças hepáticas crônicas e ter a capacidade de demonstrar respostas iniciais das CPH [126].

Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre a diferenciação em hepatócitos e células da placa ductal, que posteriormente se desenvolverão em ductos biliares. A partir da vigésima semana gestacional, as células da placa ductal começam a expressar CK7 e esse imunofenótipo permanece em ductos biliares maduros. Entretanto, os hepatócitos não expressam essa citoqueratina [127].

Atualmente defende-se o conceito de que CPH bipotenciais residentes nos canais de Hering possuem a capacidade de diferenciação tanto em células biliares quanto em hepatócitos, e que células epiteliais biliares podem sofrer transição para fibroblastos no desenvolvimento da fibrose periportal em doenças hepáticas crônicas [126].

Os canais de Hering são supostos sítio de origem das CPH, que são células capazes de repovoar o fígado após injúria e dano celular. A bile excretada por hepatócitos alcança os ductos biliares interlobulares através de canalículos biliares, que são delimitados por hepatócitos. Os canalículos biliares são unidos aos ductos biliares intralobulares e intraportais pelos canais de Hering (**Figura 3**). Esses canais foram descritos por Ewald Hering em 1847 [128], e, posteriormente, foram mais bem caracterizados por microscopia eletrônica e imuno-histoquímica [129]. Trata-se de estruturas localizadas no interior do lóbulo hepático, junto à placa limitante, que recebem a bile oriunda dos canalículos biliares e drenam para os ductos biliares intraportais ou para dentro do lóbulo hepático através de ductulos biliares intralobulares. Os canais de Hering são revestidos por hepatócitos e por células epiteliais biliares e apresentam íntima associação anatômica com vênulas que se ramificam de vênulas portais, juntos formando a unidade microcirculatória hepática [126].

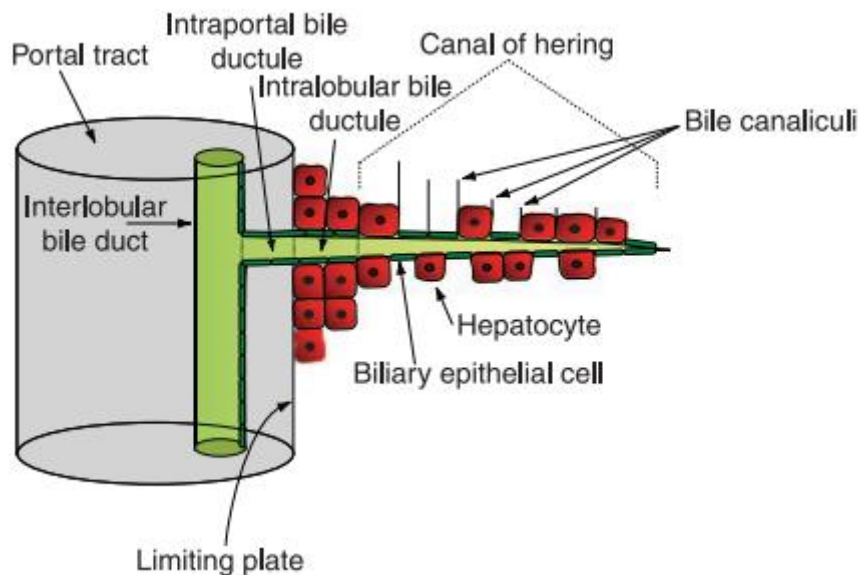


Figura 3. Microanatomia biliar do fígado humano. Fonte: Bateman e Hübscher, 2010 [126].

No tecido hepático normal a CK7 é fortemente expressa por ductos biliares interlobulares, ductos biliares intraportais e intralobulares, e por células epiteliais biliares que revestem parcialmente os canais de Hering. É possível que estas células epiteliais biliares CK7+ representem CPH, contrastando com hepatócitos normais que não expressam CK7 [130].

A ativação de CPH com subsequente maturação para hepatócitos e células da linhagem biliar foi demonstrada em uma variedade de doenças hepáticas crônicas, como a hepatite, sendo a expressão da CK7 em hepatócitos também observada nessas doenças [126]. Na cirrose biliar primária (CBP), essa expressão já é bem reconhecida e inclusive foi demonstrado uma correlação positiva com os estágios da doença [131].

A importância das CPH (equivalentes a células tronco hepáticas) na capacidade regenerativa do fígado se destaca em situações de injúria hepática crônica, como na hepatite. Historicamente, um tipo celular denominada “célula oval”, descrito em modelos animais, nas regiões portal e periportal após lesão hepática, foi capaz de expressar marcadores biliares como CK7, assim como marcadores hepatocitários. A partir dessa célula, a designação CPH foi proposta para descrever um tipo celular equivalente no tecido hepático humano. Embora não seja exatamente análoga às células ovais, as CPH se caracterizam por ainda expressarem antígenos biliares e hepatocelulares [132].

Na hepatite C crônica, o conceito de CPH com capacidade de maturação em epitélio biliar e hepatócitos é apoiado por diversos estudos [126, 133-135]. Por exemplo, a expressão imuno-histoquímica de CK7 nas infecções virais crônicas destaca a reação ductular biliar e células individuais na região centrolobular do fígado, com a intenção de representar CPH. A expressão de CK7 também é observada em hepatócitos nessas condições. A partir desse fato, foi interpretado como evidência *in vivo* de que CPH são capazes de diferenciação em células ductulares e hepatócitos maduros em resposta à injúria hepática crônica, sendo inclusive demonstrado na hepatite crônica um aumento em paralelo entre o grau de atividade e estágio da doença e a intensidade de reação ductular biliar, o número de células progenitoras e a proporção de hepatócitos expressando CK7 (**Figura 4**) [133, 135]. A associação positiva entre a expressão hepatocitária de CK7 e o estágio da doença hepática sugere que o aumento da matriz extracelular presente na fibrose avançada e cirrose possa produzir um fator de maturação ou sobrevivência para CPH [136].

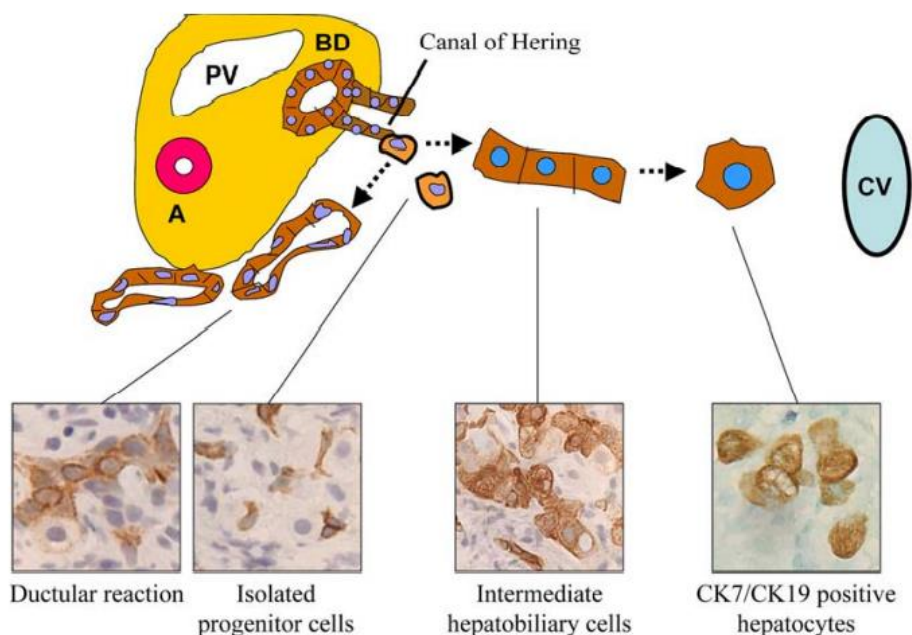


Figura 4. Representação esquemática de tipos de células periporais com imunocoloração CK7 na hepatite C crônica, com as fotomicrografias reais desses constituintes demonstrados abaixo. As setas tracejadas indicam as potenciais vias pelas quais as CPH ativadas nas proximidades dos canais de Hering e dão origem a diferentes tipos celulares CK7+. Estruturas do espaço porta: PV (veia porta), A (ramo da artéria hepática), BD (ducto biliar) e na região centrolobular a CV (veia central). Fonte: Eleazar et al., 2004 [133].

A reação ductular (RD) originária foi descrita como pequenas estruturas biliares múltiplas, com lúmens visualizados, localizadas predominantemente na periferia dos tratos portais, caracterizando uma reação ductular marginal, presente em diversos quadros agudos e crônicos, como na hepatite [137]. Supõe-se que a RD ocorra nas doenças hepáticas crônicas como um mecanismo protetivo que permita manter o fluxo intra-hepático dos ácidos biliares [138].

Assim, especula-se que a RD seja o resultado de uma interação complexa entre a CPH, hepatócitos, células estreladas hepáticas e matriz extracelular, bem como células inflamatórias e endoteliais. Alterações no suprimento sanguíneo e no fluxo biliar também são gatilhos importantes para esse processo. Provavelmente tais interações são moduladas por uma variedade de fatores solúveis que incluem diversas interleucinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o receptor beta do fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ), assim como a inervação direta de células estreladas hepáticas [137, 139].

Acredita-se que a CPH seja a mais provável origem celular da reação ductular, apesar de também ser postulado a origem a partir de ductulos biliares pré-existentes, ou seja, estruturas com lúmens reconhecíveis, ou metaplasia de hepatócitos periportais. Há também evidências de que células de fenótipo hepatobiliar intermediário existam no interior das reações ductulares e tais células parecem capazes de se diferenciar em ductulos biliares ou hepatócitos [13, 140, 141].

A RD e a presença de CPH CK7+ se associam comumente à fibrose portal e septal também em doenças hepáticas crônicas não biliares como na hepatite viral, podendo ser observadas em variados graus [142].

Diversos fatores parecem estar envolvidos na patogênese da fibrose periportal que ocorre em associação com a RD, como a produção direta de proteínas da matriz pelas próprias células epiteliais biliares, a estimulação indireta da fibrogênese através da produção de fatores que estimulam fibroblastos e miofibroblastos do trato portal, e o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (TEM), no qual células epiteliais biliares sofrem transição para o fenótipo mesenquimal, auxiliando na fibrogênese hepática [143]. Acredita-se que, através do fenômeno de TEM, possivelmente ocorra uma ligação entre o dano biliar e o desenvolvimento da fibrose periportal, e tal ligação provavelmente seja mediada pelo TGF- $\beta$  derivado de ductos biliares lesados ou de células T infiltrantes [126].



## 2.10 A resposta imune na infecção pelo HCV

Na infecção pelo HCV, a resposta imune do hospedeiro se constitui da resposta imune inata e resposta imune adaptativa, e exerce importância central, independente do desfecho clínico da infecção.

### 2.10.1 *Imunidade Inata*

A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra infecções virais. Ela atua de forma específica, detectando infecções através de receptores de reconhecimento padrão (RRPs). Os RRP's exercem imunovigilância contínua, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos por patógenos invasores, ocorrendo, assim, a ativação dos genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias, e produzindo citocinas pró inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e interferons (IFNs) tipos I e III [144].

Na infecção pelo HCV, a família dos receptores transmembrana Toll-like (TLR), a via citosólica desencadeada pela ligação do RNA viral ao RNA helicase do gene I indutível pelo ácido retinóico (RIG-I) e a proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5) são importantes vias de RRP's que detectam o genoma viral. Elas convergem na ativação de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e do fator regulador dos IFN3 e IFN7, e esses, quando ativados, ligam-se a elementos de resposta nos genes promotores dos IFNs tipo I e III [144].

Os IFNs são as citocinas centrais responsáveis pela indução do estado antiviral nas células e ativação e regulação dos outros componentes celulares envolvidos. Iniciam uma resposta imune antiviral não específica através da indução de produtos antivirais, além de atuarem como imunomoduladores, originando células imunes distintas, para responderem eficientemente ao ataque do patógeno ao hospedeiro [145]. Os IFNs do tipo I (proteínas IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) e tipo III (proteínas IFN $\lambda$ ) são os principais componentes do sistema imune inato antiviral, produzidos por células infectadas e por células sentinelas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas (DCs). Os IFNs tipo I e III se ligam aos seus respectivos receptores IFN $\alpha/\beta$  e IFN $\lambda$  e induzem a um estado antiviral pela ativação transcricional de centenas de genes. O conjunto específico de genes difere entre os IFNs e o tipo de célula alvo, e o número de genes regulados por IFNs também difere entre as células [144]. Após a ligação ao seu receptor específico, os IFNs atuam ativando vias intracelulares, como as proteínas ativadoras de transcrição (STATs),

transdutores de sinais e o sistema kinase Janus-ativado (JAK). A ativação dessas vias transmite sinais da superfície celular ao núcleo e leva à indução de múltiplos genes estimulados por IFN (ISGs) que, através de diferentes mecanismos, exercem ação antiviral potente. A sinalização através da via JAK-STAT é regulada por inibidores, como proteínas de sinalização de citocinas (SOCS) e a peptidase 18 específica da ubiquitina (USP18) [144].

Na fase aguda da infecção pelo HCV, chimpanzés infectados experimentalmente apresentaram os ISGs continuamente super regulados, o que sugere que a ativação destes genes ocorra logo após a infecção [146]. Foi demonstrado que a extensão e duração da indução dos ISGs apresenta correlação positiva com os títulos virais, que são considerados o gatilho para a indução da resposta antiviral. Isso sugere que o regulador mais importante da indução dos ISGs na fase aguda inicial da infecção pelo HCV seja a quantidade de vírus derivado dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) [147].

Na infecção pelo HCV, a resposta do IFN ocorre em todos os pacientes infectados, independente do desfecho clínico ser infecção autolimitada ou infecção crônica. Entretanto, é considerada insuficiente na maioria dos indivíduos para a resolução espontânea da infecção aguda [145, 146]. Possivelmente esta resposta exerça importante papel na contenção da infecção nos primeiros momentos do contágio. Porém, o crescimento exponencial dos títulos virais logo após a infecção, associado à alta expressão inicial dos ISGs, seguido por carga viral estável até a emergência da resposta imune celular, demonstra claramente que a resposta inata do IFN é incapaz de erradicar a infecção [145].

Nas semanas iniciais de infecção pelo HCV, a replicação viral é fortemente inibida e, em cerca de 30% dos pacientes, o vírus é completamente eliminado. Embora os ISGs sejam fortemente induzidos durante o período de infecção aguda, essa resposta inata não é capaz da depuração viral na maioria dos indivíduos e a infecção pode persistir em cerca de 70% deles [148].

A observação de que níveis de RNA viral aumentavam apesar de a indução do IFN, demonstrou que mecanismos de evasão viral estejam possivelmente envolvidos, contribuindo para a falha na depuração [149]. Em 2009, Rehnermann demonstrou que a protease do vírus NS3/NS4A atuam bloqueando a sinalização desencadeada por TLR3 e RIG1, e que, além disso, a proteína core do vírus interfere no nível da sinalização JAK/STAT e produção dos ISGs.

Na fase tardia da infecção aguda, em torno da sexta semana, ocorre o recrutamento de células T específicas e o perfil de expressão gênica no fígado muda para um padrão IFN- $\gamma$ , concomitantemente, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) aumentam (**Figura 5**) [150, 151].

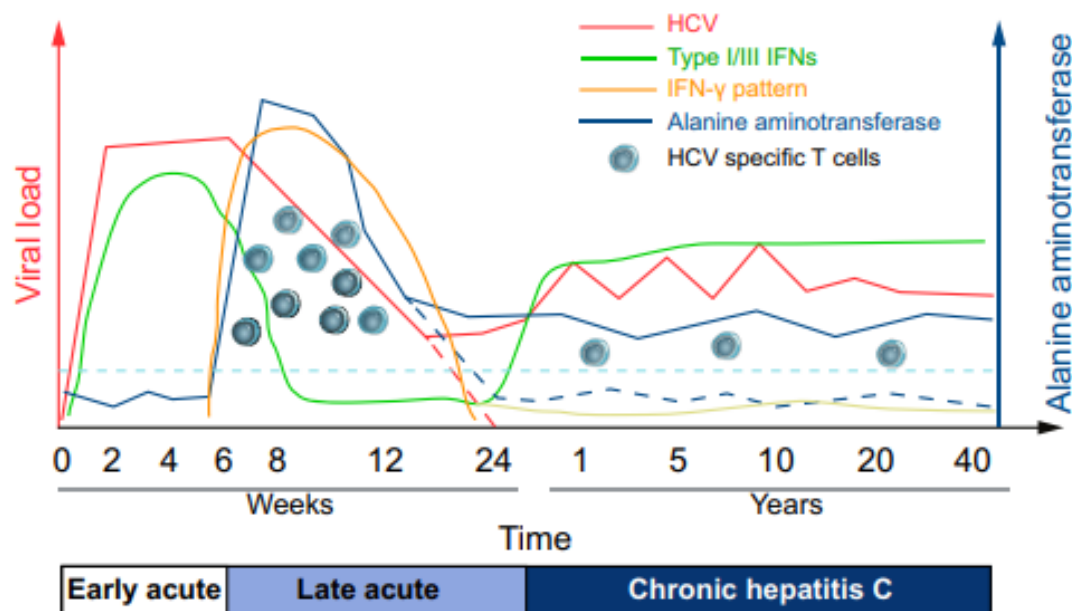


Figura 5. Curso natural da infecção pelo HCV – aumento da carga viral dias após a infecção e chegada em um platô de 10<sup>5</sup>–10<sup>7</sup> IU/ml (IUs corresponde aproximadamente ao equivalente em genoma). Na fase inicial da infecção aguda (primeiras 4–8 semanas), a resposta imune inata dirigida por IFNs tipos I ou III IFNs talvez limite a replicação viral. Na fase tardia da infecção aguda, ocorre o recrutamento de células T específicas e o perfil de expressão gênica modifica para um padrão IFN-gama. Ocorre um aumento simultâneo dos níveis de alanine aminotransferase (ALT) e alguns pacientes se tornam ictericos. Nessa fase, em cerca de 30% dos pacientes, a replicação viral é fortemente inibida, o vírus é completamente eliminado, os níveis ALT retornam ao normal a cura da infecção ocorre. Em 70% dos pacientes, a infecção persiste e a alanine transaminase permanece elevada. Na fase crônica da infecção, o infiltrado celular persiste em níveis baixos, mas a expressão dos ISGs dirigida por IFN-gama desaparece. Entretanto, em cerca da metade dos pacientes, os genes estimulados por IFN I e III são novamente fortemente induzidos. Os outros pacientes apresentam pouca ou nenhuma ativação dos ISGs no fígado. Fonte: Heim e Thimme, 2014 [144].

O aparecimento das respostas T CD8<sup>+</sup> coincide com o início da doença hepática e uma queda nos títulos virais. Nessa fase da infecção, as células T CD8<sup>+</sup> específicas exibem um fenótipo ativado com expressão de CD38<sup>+</sup> e alta expressão de PD-1. Nessa fase inicial da infecção aguda, as células T CD8<sup>+</sup> específicas apresentam um fenótipo “confuso” e não produzem citocinas antivirais, como IFN- $\gamma$  [152].

### 2.10.2 *Imunidade Adaptativa*

A infecção aguda pelo HCV se caracteriza por atraso significativo no início das respostas T específicas adaptativas e sugere uma falência da imunidade inata em conter a replicação viral e promover sinais necessários para iniciar a imunidade adaptativa eficiente. A evolução crônica da infecção está associada ao importante prejuízo da imunidade adaptativa, além da evasão do sistema imune pelo vírus [153].

A imunidade adaptativa consiste na resposta imune humoral, com a produção de anticorpos pelas células B, e na resposta imune celular com linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) e T CD4+ helper (Th). Na infecção pelo HCV, uma resposta funcional e patógeno específica de células T CD8+ são os principais determinantes para a eliminação do vírus e prevenção da cronicidade [152].

As células T CD8+ específicas possuem papel crucial no desfecho da infecção aguda. Respostas T CD8+ vigorosas e com robusta produção de IFN $\gamma$  são correlatos imunológicos fortes da resolução espontânea da infecção aguda, e respostas T CD8+ fracas são observadas em hospedeiros com infecção crônica [152, 154].

Nos indivíduos com infecção autolimitada, após a depuração do vírus, a população de células T efetoras (Teff) declina e células T se diferenciam em população de memória. Essas células possuem a habilidade de autorrenovação, aptas a reativarem rapidamente funções efetoras e proliferarem em caso de reestimulação antigênica. Infecções autolimitadas se associam a respostas efetivas dos linfócitos T helper (LTh) e T citotóxicos (LTC) e a altos níveis de IL-21 [155]. Uma resposta imune eficaz ocorre, na qual as células T CD8+ não são mais desencadeadas por estimulação antigênica contínua e começam a expressar altos níveis do marcador de memória CD127, necessário para a proliferação homeostática e declínio na frequência. Nessas situações, as respostas T CD8+ de memória são mantidas, podendo se expandir novamente em casos de reinfeção. Entretanto, apesar dessa formação de memória, a persistência viral é possível após a reinfeção e quase sempre está associada ao aparecimento de mutações de escape [156].

#### 2.10.2.1 *Respostas T CD4+*

As células T CD4+ atuam de forma importante na resolução da infecção aguda pelo HCV. Em indivíduos que curaram espontaneamente a infecção, foram demonstradas respostas T CD4+ significativamente mais efetivas em frequência, vigor e extensão. Naqueles que desenvolveram infecção crônica, as células T CD4+ exerceram defeitos proliferativos, seguidas de sua deleção [157].

As células T CD4<sup>+</sup> reconhecem antígenos apresentados pelas moléculas MHC classe II sobre a superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) e exercem funções efetoras, como a ativação direta de macrófagos e células B antígeno específicas, assim como a ativação de células T CD8<sup>+</sup> [158].

As células T CD4<sup>+</sup> possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens distintas, atuando como reguladores centrais da imunidade adaptativa e facilitam tanto as respostas T CD8<sup>+</sup> que atuam como efetores principais quanto a resposta de anticorpos a patógenos virais. A regulação das respostas T CD8<sup>+</sup> representa seu dever central e, dependendo do contexto imunológico, pode apoiar e suprimir essas células. Para a função efetora completa das células T CD8<sup>+</sup>, é necessário o auxílio de células T CD4<sup>+</sup>. Respostas fracas ou prejudicadas de células T CD4<sup>+</sup> específicas com produção limitada de IL-2 e IL-21 se correlacionam com uma resposta diminuída das células T CD8<sup>+</sup> específicas e com a persistência viral [152].

Durante a infecção aguda pelo HCV, as células T CD4<sup>+</sup> específicas inicialmente se expandem para formar uma resposta multiespecífica e multifuncional, independentemente do resultado da infecção. Entretanto, nos casos de resolução, as respostas T CD4<sup>+</sup> permanecem na infecção aguda persistente e essas células são rapidamente eliminadas [157; 159]. Durante a infecção aguda, as células T CD4<sup>+</sup> específicas procedem de um fenótipo ativado com expressão de PD-1, CTLA4 e CD38, para um estado de memória após a eliminação viral, definido por regulação positiva de CD127 e regulação negativa de marcadores de ativação [160, 161].

Em modelos de chimpanzé, foi demonstrado que tanto a depleção de células T CD4<sup>+</sup> quanto de células T CD8<sup>+</sup> interfere na depuração viral. Onde se correlacionou a depleção de células T CD8<sup>+</sup> com a viremia prolongada, quando comparado aos chimpanzés controle, a infecção se resolveu após essas células terem sido detectadas. Em contraste, a depleção de células T CD4<sup>+</sup> resultou em viremia persistente, associada à evolução de mutações de escape viral em epítomos de células T CD8<sup>+</sup> específicas. Esses resultados apoiam o conceito de que as células T CD8<sup>+</sup> são as principais células efetoras antivirais, enquanto as células T CD4<sup>+</sup> fornecem ajuda fundamental, portanto, sendo igualmente obrigatórias para a cura da infecção [162, 163]. Na infecção crônica pelo HCV, a observação de que células T CD4<sup>+</sup> específicas são dificilmente detectadas pode explicar a resposta disfuncional das células T CD8<sup>+</sup>. Além disso, há evidências de que as células T CD4<sup>+</sup> também possam atuar diretamente sobre células infectadas através de mecanismos citotóxicos, apresentando papel na injúria hepática (**Figura 6**) [164].

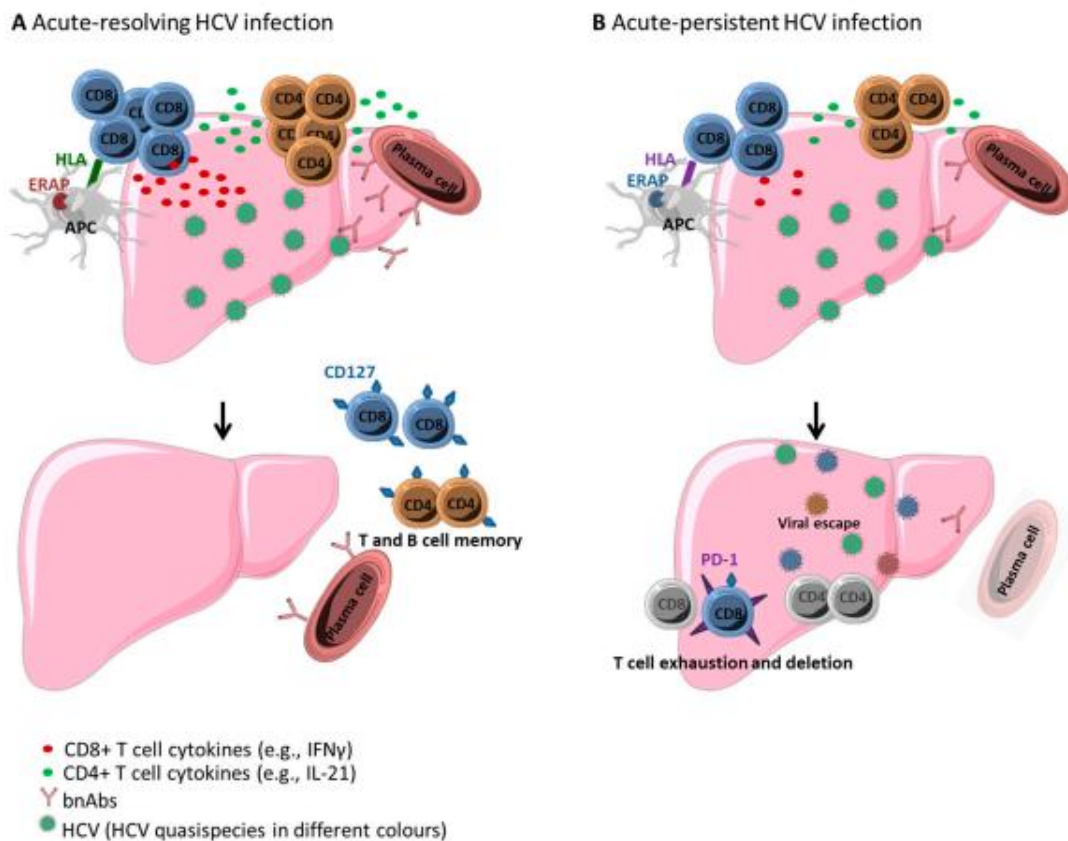


Figura 6. Resposta imune adaptativa específica na hepatite C - (A) Na infecção aguda com resolução, são iniciadas respostas T CD4+ e T CD8+ multiespecíficas e vigorosas, e há produção de anticorpos neutralizantes pelos plasmócitos (bnAbs). Após a eliminação do vírus, células de memória (expressando, por exemplo, CD127) são mantidas. (B) Na infecção aguda persistente, a resposta imune adaptativa inicial específica é semelhante. No entanto, as células T CD4+ são perdidas, e as células T CD8+ se esgotam rapidamente. Há excesso de regulação sustentada de moléculas coinibitórias do checkpoint imune e ocorrem respostas disfuncionais. A exaustão linfocitária e as mutações de escape viral anulam o reconhecimento por células T CD8+ específicas. Fonte: Kemming et al., 2020 [152].

Apesar dos papéis compartilhados no curso da infecção pelo HCV, as respostas T CD4+ e T CD8+ específicas diferem em natureza e magnitude. As células T CD4+ específicas são inicialmente ativadas e detectáveis em todos os indivíduos infectados. No entanto, elas declinam rapidamente na infecção persistente e dificilmente são detectáveis quando a cronicidade é estabelecida. Já as respostas T CD8+ específicas são multifuncionais e de longa duração, sendo mantidas mesmo durante a infecção persistente, embora possam eventualmente perder sua funcionalidade e alterar seu fenótipo [157, 159].

### 2.10.2.2 *Respostas T CD8+*

As respostas T CD8 + específicas exercem papel central no controle da infecção pelo HCV [165], e o status de sua ativação e a intensidade da resposta imune que a acompanha são determinados pelo equilíbrio entre a coestimulação positiva e negativa [166, 167].

A ativação dos linfócitos T CD8 + ocorre com a interação física entre seu receptor de célula T (TCR) e o complexo principal de histocompatibilidade I (MHC classe I), assim como entre a ligação entre moléculas coestimulatórias com seus ligantes, ocorrendo em um ambiente de citocinas adequado [168]. Quando ativados, exercem diferentes funções efetoras, como citotoxicidade e secreção de citocinas, como IFN $\gamma$ , e fator de necrose tumoral (TNF), tornando-se capazes de inibir a replicação viral. Após concluírem suas tarefas, as células T efetoras (Teff) finalizam sua atividade expressando transitoriamente moléculas coestimulatórias negativas com a função de atenuar sua ativação. Assim se origina uma população de células T de memória sustentada (Tmem). Em situações de estimulação antigênica persistente as células Tmem não se desenvolvem eficientemente e ocorre a exaustão celular [169].

Na infecção pelo HCV, a inabilidade das células T CD8+ em montar respostas robustas e duradoras é considerada crucial para o desenvolvimento e manutenção da persistência da infecção. A perda do auxílio das células T CD4+ e a produção de citocinas imunomoduladoras pelas células T reguladoras (Tregs) podem contribuir para o prejuízo das respostas T CD8+. Entretanto, os principais mecanismos que contribuem para a persistência do vírus são o escape viral e a exaustão das células T [170].

### 2.10.3 *Escape viral*

O escape viral ocorre tipicamente durante a fase inicial da infecção e é definido pela substituição de aminoácidos dentro de epítomos de células T, com mutações detectáveis em cerca de 50% deles [171-173]. Essas mutações podem se desenvolver nas âncoras de ligação de MHC classe I do epítomo, abolindo ou diminuindo sua afinidade de ligação para a esta molécula, em posições responsáveis pelo reconhecimento do receptor de células T (TCR) ou nos sítios flanqueadores do epítomo, influenciando o processamento proteossomal [174].

A perda de reconhecimento por escape viral pode não ser completa, mas a iniciação de respostas T *de novo* contra epítomos mutantes não ocorre na infecção persistente pelo HCV. O motivo de não ocorrer é possivelmente devido à falta de auxílio das células T CD4+ e à alta carga viral durante os estágios posteriores de infecção persistente. A perda do reconhecimento antigênico devido a mutações de escape dentro de epítomos celulares, assim como o status de diferenciação das células T CD8+, são fatores que influenciam os padrões de expressão dos receptores inibitórios [174]. Uma vez que células T CD8+ direcionadas aos epítomos mutados não são mais expostas ao desencadeamento constante do TCR, essas células adquirem um estado semelhante à memória, ao invés de um fenótipo de exaustão com expressão de CD127 e potencial proliferativo sustentado [175].

#### 2.10.4 Exaustão de células T CD8+

As células T exaustas (Tex) representam uma população distinta com uma via única de diferenciação, funcionalidade e dinâmica quando comparadas às células T<sub>eff</sub> e T<sub>mem</sub> [169]. Essas células apresentam modificações na expressão gênica que incluem alterações significativas nos genes que codificam receptores inibitórios (IRs) e fatores de transcrição, e genes que controlam as vias de sinalização de TCR, sinalização de citocinas e metabolismo celular [176]. As células Tex se caracterizam pela perda de funções efetoras, expressão aumentada e sustentada de receptores inibitórios (IRs), e incapacidade de transição para o estado quiescente [177, 178].

A exaustão de células T CD8+ específicas foi identificada pela primeira vez durante a infecção pelo vírus da linfocoriomeningite crônica (LCMV), onde foram definidas como células funcionalmente comprometidas, inaptas a produzir citocinas antivirais e ineficazes no controle da infecção [179, 180]. A partir de então, outros trabalhos subsequentes descreveram a exaustão das células T, e as células Tex foram reconhecidas como um tipo único de célula imune com papel central na autoimunidade, infecções crônicas e no câncer [181, 182].

Ao longo do processo de exaustão celular, ocorre uma perda progressiva e hierárquica do potencial proliferativo e funcionalidade, ou seja, quanto maior a carga de antígenos ou a duração da doença, maior a extensão da exaustão. Há uma perda gradual das funções efetoras das células T CD8+, com respostas adaptativas de curto alcance a epítomos virais, perda da capacidade proliferativa e secreção anormal de citocinas, até a perda da citotoxicidade, que é



acompanhada por regulação positiva de receptores inibitórios [183]. Conforme ilustrado na **Figura 7**, normalmente funções como produção de interleucina IL-2 e alta capacidade de expansão são perdidas primeiro; essa fase é denominada “exaustão parcial I”. No próximo estágio, “exaustão parcial II”, essas células perdem a capacidade de produzir fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$ , e a citotoxicidade e capacidade de expansão são prejudicados. Por fim, ocorre a perda da capacidade de produção de IFN- $\gamma$  induzida por antígeno. O estágio final de exaustão se caracteriza pela deleção por apoptose, observada em alguns cenários com alto estímulo antigênico [184, 185].

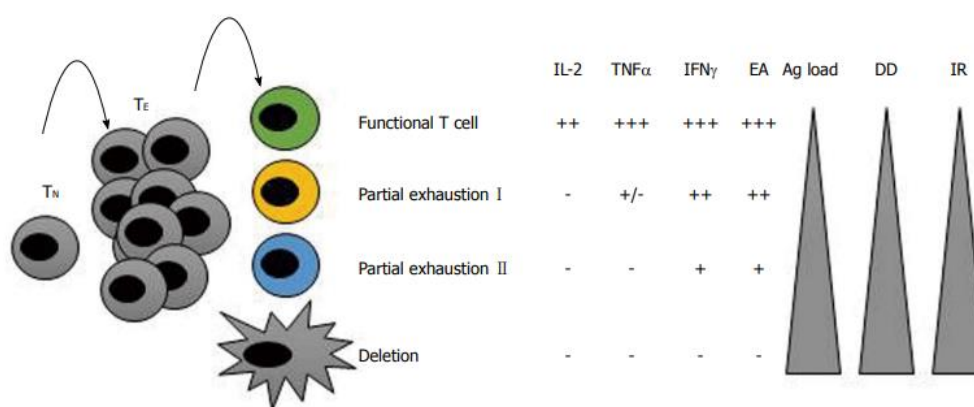


Figura 7. Exaustão de células T na antigenemia persistente e alta. Diferenciação inicial de células T naive (TN) em células T efectoras (TE). Na infecção aguda, células T efectoras funcionais após eliminarem o antígeno são deletadas por apoptose e uma população de memória é gerada e mantida. Na infecção crônica, essas células perdem gradualmente sua capacidade efectora e quanto maior a carga antigênica ou a duração da infecção, maior a exaustão. “Exaustão parcial I” – perda da produção de IL-2, e perda da capacidade de expansão. “Exaustão parcial II” – perda da capacidade de produzir fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, menor produção de IFN-y e menor proliferação. Fase final de exaustão – deleção por apoptose. Quanto maior a carga antigênica (Ag load) e duração da doença (DD), maior a expressão de receptores inibitórios (IR). Fonte: Moreno-Cubero e Larrubia, 2016 [186].

No contexto da infecção crônica pelo HCV, a manutenção a longo prazo das células Tex se atribui à necessidade *in vivo* de estimulação por peptídeos antigênicos. O estímulo antigênico persistente interfere drasticamente na funcionalidade, fenótipo, metabolismo e perfis epigenético e transcricional das células imunes adaptativas [169]. No entanto, supõe-se que essas respostas T disfuncionais sejam capazes de prevenir o dano hepático acelerado [187-189]. Nesse contexto, o HCV desenvolve mecanismos que induzem a coexpressão sustentada de IRs que fornecem sinais coestimulatórios negativos para as células T, resultando na incapacidade dessas células em montarem uma resposta imune robusta. A ligação das moléculas coestimulatórias negativas aos seus respectivos ligantes atuam para interromper os processos de proliferação de células T, bem como a

secreção de citocinas tipo I e estão relacionadas ao desenvolvimento de funções citolíticas, criando assim um ambiente que permite a evasão do vírus [190]. Na infecção crônica por HCV, o vírus modula mecanismos que induzem a exaustão hierárquica das células T específicas, e a dependência do antígeno foi sugerida após a perda de células Tex com a terapia antiviral ou em situações de escape viral [175, 191].

Embora a estimulação antigênica persistente e em níveis altos seja provavelmente o principal evento que leve à exaustão das células T CD8+, diversos outros fatores ambientais claramente desempenham importante função na formação, promoção ou até antagonização desse processo. As células T CD4+, por exemplo, exercem ação sobre as respostas celulares T CD8+, incluindo a produção de IL-2 e/ou IL-21 e a ativação e interação com as APCs via produção de quimiocinas [192, 193]. As células T CD4+ Tregs possuem propriedades imunossupressoras que atuam sobre a ativação e proliferação das células Teff durante a fase aguda e fase crônica inicial da infecção pelo HCV. Além disso, essas células têm sido implicadas na promoção da exaustão das células T, através da produção de citocinas imunomoduladoras como IL-10 e TGF- $\beta$  [193]. Em 2013, Veiga-Parga et al. [194] demonstrou que na infecção crônica pelo HCV o número total de Tregs aumenta no local da infecção.

Estudos demonstraram uma população celular menos exausta, definida pela expressão de CD127 e PD-1, e coexpressão de TCF1, que mostra reter sua capacidade proliferativa; e uma população CD127-PD-1 $^{high}$  severamente esgotada [191, 195]. Essa população celular terminalmente esgotada demonstrou alterações transcricionais e epigenéticas irreversíveis pela remoção de antígeno ou imunoterapia, enquanto a população de células menos esgotada demonstrou resposta [195, 196].

O estudo de Gardiner e colaboradores (2013) [197] examinou a imunoterapia anti-PD-1 no contexto da infecção crônica pelo HCV. Foi demonstrada eficácia limitada, com redução apenas transitória da viremia em um subconjunto de pacientes. Outro estudo com imunoterapia anti-PD-1 em chimpanzés com infecção persistente por HCV demonstrou queda transitória na viremia em um dos três animais tratados, sem lesão hepatocelular aparente. Os resultados sugerem que um limiar crítico de células T específicas preexistentes no fígado seja necessário e considera estratégias terapêuticas de vacinação em combinação com a imunoterapia para ampliar as respostas estreitas [198].

Dois fatores de transcrição T-box, T-bet e Eomesodermin (Eomes), regulam as respostas T CD8<sup>+</sup> funcionais e disfuncionais durante as infecções virais crônicas, e tem sido demonstrado que a expressão reduzida do fator de transcrição T-bet em células T CD8<sup>+</sup> específicas se relaciona a sua disfunção [199]. A exaustão de células T terminais também é caracterizada pela alta expressão do fator de transcrição Eomes, que está em equilíbrio com seu homólogo T-bet. No contexto da infecção pelo HCV, as infecções agudas persistentes e crônicas são caracterizadas por uma baixa frequência de células T CD8<sup>+</sup> específicas para T-bet+Eomes, em comparação a infecção aguda curada [200]. Baseado em suas capacidades funcionais e fenótipos, essas células são denominadas “células de memória” e tendem a expressar baixos níveis de PD-1 e níveis maiores de marcadores de homeostase e do receptor IL-7 de cadeia alfa CD127, um marcador de memória da célula T. Em contraste, células T CD8<sup>+</sup> com altos níveis de PD-1 e forte expressão de Eomes, em número elevado na infecção crônica, exercem capacidade reduzida de “*turnover*” e são conhecidas como “terminalmente exauridas” [173]. Em 2012, Paley e colaboradores [199] demonstraram que na infecção crônica por HCV as células T CD8<sup>+</sup> intra-hepáticas expressam altos níveis de Eomes, sem expressão relevante de T-bet, sugerindo que na infecção crônica por HCV as células T CD8<sup>+</sup> pertençam ao subtipo “terminalmente exauridas”.

Foi também identificado o fator de transcrição HMG-box TOX como crucial para a formação de células T exaustas. Demonstrou-se que o TOX traduz a estimulação persistente do antígeno em um programa transcricional e epigenético distinto e que, em sua ausência, as células T exaustas não se formam [201]. A deleção do domínio de ligação ao DNA de TOX reduziu a expressão de PD-1, aumentando a função efetora das células T, mas, em última análise, essas células foram deletadas. Isso indicou que a disfunção e a exaustão das células T é um programa natural necessário para manter as populações de células expostas ao constante desencadeamento de antígenos [201]. O estudo da expressão de TOX em células T CD8<sup>+</sup> específicas mostrou que a expressão de TOX foi alta em células T CD8<sup>+</sup> específicas virais em pacientes com infecção crônica, mesmo após a cura mediada por DAA. As células T CD8<sup>+</sup> específicas de pacientes que resolveram espontaneamente a infecção aguda pelo HCV, no entanto, exibiram baixa expressão de TOX [202].

Os receptores inibitórios exercem seus efeitos regulatórios negativos sobre as células T efetoras por meio de múltiplos mecanismos, incluindo vias de sinalização convencionais e não convencionais, competição com receptores e ligantes coestimuladores ou uma combinação de ambos (**Figura 8**). Receptores inibitórios, como o PD-1, contém domínios ITIM ou ITSM intracelular, que podem recrutar proteínas SHP e outros adaptadores que podem interferir com sinais positivos do receptor de células T e moléculas coestimuladoras, como CD28. Outros receptores inibitórios, como CTLA-4, competem diretamente pela ligação a moléculas coestimuladoras ou seus ligantes. Outros receptores inibitórios, como Lag-3 e Tim-3, fornecem sinais negativos para células T usando motivos não ITIM ou não ITSM e interferem na proliferação de células T e produção de citocinas através da inibição de cascatas de sinalização positiva. Os receptores inibitórios também podem utilizar a sinalização negativa e competição combinadas para inibir a ativação de células T [154].

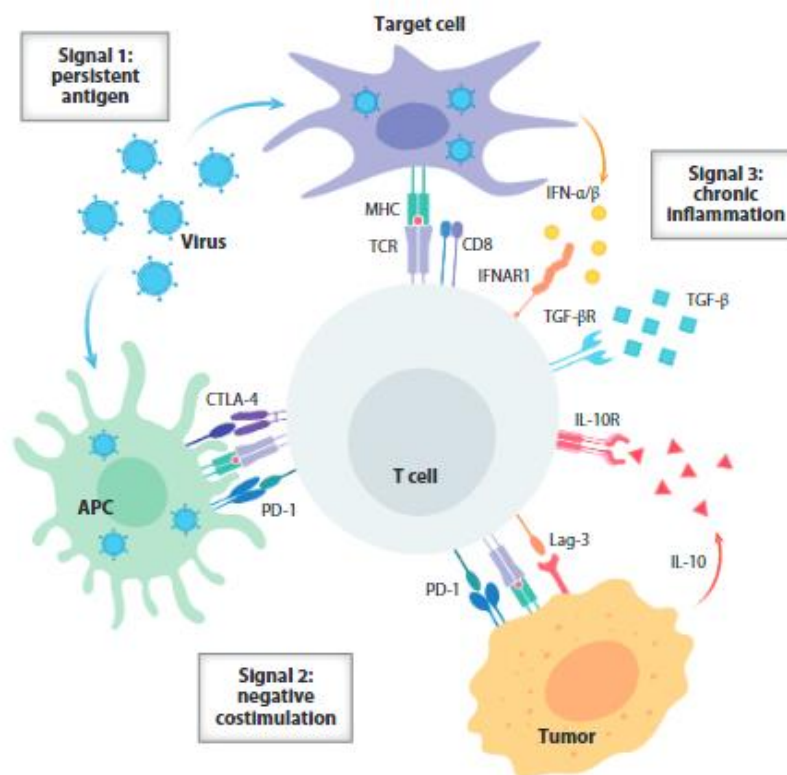


Figura 8. Desenvolvimento da exaustão celular na persistência do antígeno (sinal 1) que leva a hiperativação da célula T e coexpressão sustentada de múltiplos receptores inibitórios nas células T e seus ligantes. Os receptores inibitórios fornecem sinais coestimulatórios negativos (sinal 2). O estado de inflamação crônica leva a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN-alfa e beta) e inibitórias (IL-10 e TGF-beta), que agem sinergicamente a exaustão. Fonte: McLane et al., 2019 [154].

### 2.10.5 Outros componentes imunes no HCV

O sistema imune intra-hepático é caracterizado por um repertório único de linfócitos, e os diferentes subtipos de células imunes desempenham papéis importantes na patogênese, progressão e resultados do tratamento da infecção pelo HCV [150]. As respostas das células T CD3+, CD4+ e CD8+ são elementos essenciais no controle da infecção pelo HCV, e o prejuízo nessas respostas é considerado a principal causa de falha na eliminação do HCV (Essa et al., 2021). Além disso, a persistência da infecção tem sido associada a uma estimulação parcial dos linfócitos B CD20+ [203]. Essa e colaboradores demonstraram que as contagens absolutas de células B, bem como os percentuais, diminuíram significativamente com a RVS após terapia com IFNPeg/RBV. Em seu estudo, os autores sugeriram que a redução das células B com a terapia pudesse facilitar a restauração de uma resposta imune efetiva, levando à resolução da infecção [204]. Amati e colaboradores obtiveram resultados semelhantes, descrevendo, ao final da terapia, com PegIFN/RBV contagens absolutas mais altas de células B em respondedores fracos comparado aos outros respondedores [205].

### 2.11 Linfócitos Tregs e o fator de transcrição FOX-P3

O desfecho da infecção pelo HCV parece ser determinado pelo equilíbrio das respostas T entre mecanismos supressórios e estimulatórios, e a regulação da magnitude da resposta efetora possivelmente contribui para a falência na eliminação do patógeno, podendo levar à infecção persistente [206].

A persistência viral parece ser determinada por numerosos mecanismos de escape imunológico [207], que incluem mutações proteicas, a indução da produção de citocinas imunossupressoras (TGF $\beta$  e IL10) e indução do fenótipo de exaustão de células T (expressão de moléculas coestimuladoras negativas CTLA-4, PD1 e TIM-3), além um aumento na frequência dos linfócitos Tregs [208].

Os linfócitos Tregs são uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras que representam um componente crucial do sistema imune, mantendo a autotolerância e a homeostase imunológica. Eles constituem um subtipo de células T CD4+ que expressa o receptor de cadeia  $\alpha$  da IL-2 (CD25) e são denominadas células T CD4+CD25+. Os Tregs naturais são originários do timo, considerada a maior população de células regulatórias, responsáveis pela supressão das respostas T, e representam de 5 a 10% das células T CD4+ periféricas. Esses linfócitos adaptativos se originam a partir de linfócitos T periféricos maduros induzidos ao fenótipo regulatório, na presença de IL-2 e TGF $\beta$ , como pode ser observado na **Figura 9** [209].

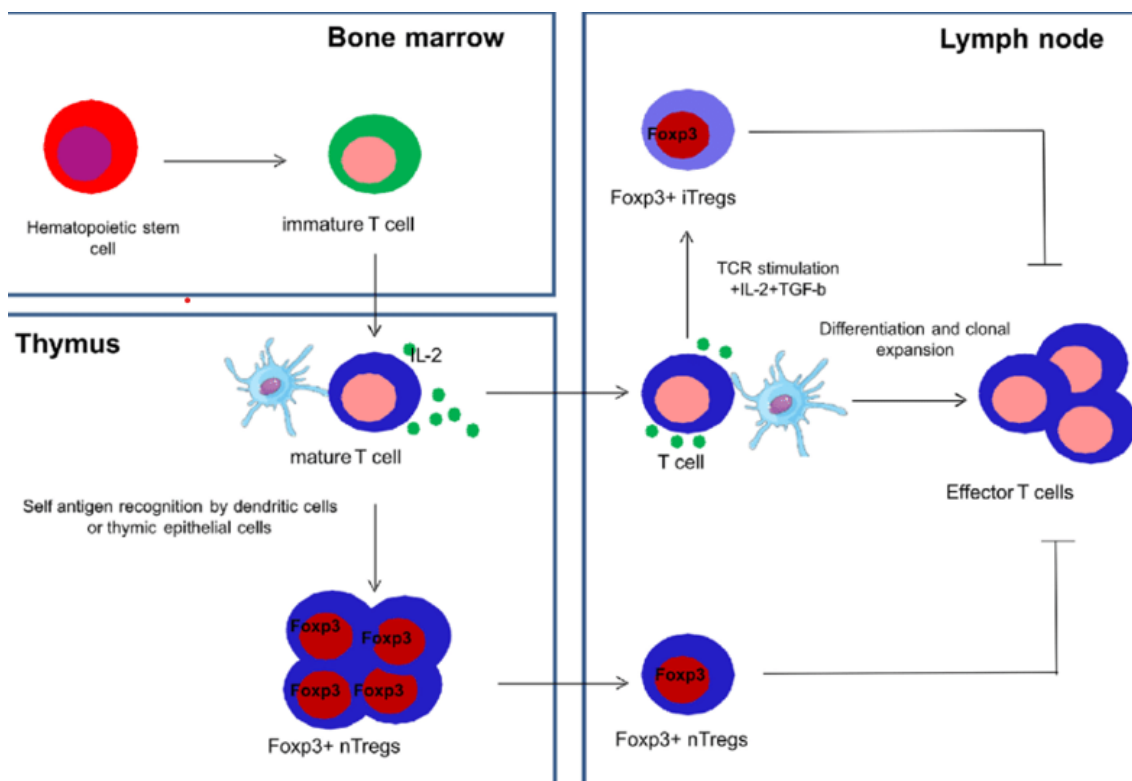


Figura 9. Desenvolvimento de linfócitos T regulatórios naturais e induzidas. Linfócitos Tregs naturais (nTregs) são derivadas do timo e são caracterizadas pela coexpressão de CD4, alta expressão de CD25 e FOXP3, e são representadas coletivamente como CD4+CD25+FoxP3+ Tregs. As células T reguladoras induzidas ou adaptativas (iTregs) são geradas nos órgãos linfoides periféricos na presença do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e da interleucina-2 (IL 2). Fonte: Ogonek et al., 2016 [210].

Além do marcador CD25, as Tregs também são definidas pela expressão constitutiva do fator de transcrição nuclear Forkhead box P3 (FOXP3). O FOXP3 pertence à família dos fatores de transcrição *forkhead* e é principalmente localizado no núcleo celular [211, 212]. Esse fator foi descrito primeiramente por Sakaguchi e colaboradores [213], quando observaram sua expressão em Tregs. Atualmente, sabe-se que a expressão dessa molécula é responsável pela diferenciação e função das células Treg [213-215], e que Tregs que expressam FOXP3 estão presentes naturalmente no sistema imunológico [216].

Ademais, esse fator de transcrição é considerado um marcador específico tanto de Tregs naturais derivadas do timo (nTregs) quanto de Tregs induzidas (iTregs) geradas nos órgãos linfoides periféricos sob indução inflamatória [214, 217]. Ele atua como um regulador transcricional da expressão gênica, que possui papel central na função supressora, identidade, estabilidade e expansão das Tregs. Seu desempenho é considerado crucial na manutenção da homeostase do sistema imunológico, na destruição imunológica de células tumorais e nas doenças autoimunes [218].

Para as funções das Tregs acontecerem, é necessário adequado controle de seus genes, e a expressão de FOXP3 é crucial no estabelecimento e manutenção da expressão gênica destas células. O FOXP3 se liga diretamente a elementos regulatórios dos genes IL-2 e IFN- $\gamma$ , e supostamente induz a desacetilação ativa de histona H3, inibindo assim a remodelação da cromatina e controlando a transcrição genica [219-223]. Dependendo da interação do FOXP3 com várias histonas desacetilases ou acetilases, ele pode atuar em Tregs tanto como ativador quanto como repressor transcricional, e mutações que ocorrem naturalmente no gene FOXP3 podem resultar em linfócitos autorreativos [219-223].

Foi relatado em modelos animais de diabetes que a indução de células Tregs positivas para FOXP3 reduziu acentuadamente a gravidade da doença autoimune, esclerose múltipla, asma, doença inflamatória intestinal, tireoidite e doença renal [224, 225].

As células reguladoras Tregs atuam indiretamente através da modulação de células apresentadoras de antígeno (APCs) ou diretamente por mecanismos de contato celular, e exercem efeitos inibitórios na proliferação das células T CD4+ e CD8+ específicas [170, 226].

As funções supressivas das Tregs ocorrem através de um número bem estabelecido de mecanismos. Além da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF $\beta$  (resposta Th2), estão associadas à regulação positiva de marcadores de ativação pró inflamatória (resposta Th1), como a superfamília dos receptores de TNF e IFN $\gamma$ , e ao aumento da expressão de moléculas imunorregulatórias, como PD-1, PD-L1 e CTLA-4. As Tregs também são capazes de esgotar fatores de crescimento cruciais oriundos do microambiente tissular, sequestrando suas funções efetoras e direcionando-os a anergia ou apoptose. Além disso, são células equipadas com potencial citotóxico, o que as torna aptas a suprimir células efetoras simplesmente exercendo sua atividade citotóxica [218, 227].

### *2.11.1 Tregs no HCV*

Na infecção pelo HCV, acredita-se que possivelmente a injúria hepática seja o resultado de respostas imunes antivirais do hospedeiro em vez da patogênese viral direta, e possivelmente as Tregs contribuam para o prejuízo da resposta imune contra o vírus [228].

A presença de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> circulantes em níveis altos foi descrita pela primeira vez, em 2003, em pacientes com hepatite C crônica por Sugimoto e colaboradores [229]. A partir desse estudo, diversos outros demonstraram uma correlação positiva entre essas células e a carga viral, destacando o papel supressor das Tregs na resposta imune adaptativa mediada por células na infecção pelo HCV [208, 229, 230].

Em 2012, Spaan e colaboradores [145] demonstraram que essas células se expandem gradualmente e se acumulam no fígado e no sangue, e sua frequência se correlacionou positivamente com a carga viral, o que indica sua contribuição para a persistência do vírus. Acredita-se que ativação e expansão das células Tregs possivelmente seja desencadeada pela proteína core do vírus da hepatite C (HCV) e pelo TGF $\beta$  secretado por hepatócitos infectados, inibindo assim as respostas imunes do hospedeiro [231].

Os níveis elevados de células Tregs observado em pacientes infectados pelo HCV podem resultar de dois mecanismos principais diretamente influenciados pelo vírus, como o recrutamento ativo de Tregs existentes através da modulação de outras células imunes, como células dendríticas e células B; e interação direta de células infectadas com os linfócitos T, favorecendo assim sua conversão em Tregs [208].

Embora a persistência viral seja supostamente favorecida pelas Tregs através da regulação da resposta imune antiviral, inicialmente essas células podem limitar a extensão da lesão hepática induzida pelo sistema imunológico. Foi relatado, em Tregs isoladas de pacientes com infecção ativa e níveis elevados de transaminase, menor atividade supressora comparativamente a Tregs de pacientes com transaminase persistentemente normal [232, 233].

A participação dos linfócitos Tregs no desenvolvimento da fibrose hepática relacionada à infecção crônica pelo HCV parece controversa. Células T CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> intra-hepáticas presentes em níveis mais elevados em fígados infectados e com limitada fibrose foram demonstradas [206, 234]. Por outro lado, fígados de pacientes com cirrose associada à infecção crônica demonstraram expressão aumentada de marcadores de Tregs quando comparados a pacientes cronicamente infectados e sem lesão hepática [235].

Além disso, as Tregs também foram associadas à promoção da fibrinogênese em células estelares hepáticas. Análise por citometria de fluxo mostrou células T CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> ativadas que expressam IL8 enriquecidas no fígado, em estreita proximidade com células esteladas hepáticas alfa-SMA<sup>+</sup> e áreas de fibrose [236]. No geral, esses resultados sugerem que diferentes subconjuntos de linfócitos Tregs possam exercer uma influência oposta sobre a fibrose relacionada à infecção pelo HCV [208].



Na hepatite C crônica, talvez a frequência de células FOXP3+ possa estar associada a parâmetros histológicos da doença, e consideramos a definição de fenômenos intra-hepáticos importante para o entendimento da imunopatogênese da infecção pelo HCV. Potencialmente, uma diminuição nos números relativos permitiria a desregulação da imunidade mediada por células T, podendo, também, predispor a inflamação e fibrose. Alternativamente, um aumento na frequência poderia aumentar a secreção de TGF $\beta$  no fígado, o que ajudaria no desenvolvimento de fibrose por células estreladas hepáticas ativadas [237].

## 2.12 Proteína 1 de morte programada (PD-1)

As moléculas do checkpoint imune, também chamadas de receptores inibitórios (IRs), regulam as funções efetoras dos linfócitos T citotóxicos com a finalidade de sustentar a autotolerância e minimizar o dano tecidual resultante da resposta imune [238]. A proteína 1 de morte programada (PD-1/CD279) é a mais reconhecida dessas moléculas, cuja função é reduzir a ativação das células T com o intuito de prevenir o dano autoimune [239]. A molécula PD1 foi descoberta em 1992 como um gene associado à apoptose, embora sua superexpressão tenha se mostrado desnecessária para a apoptose [239]. Tal descoberta impulsionou estudos posteriores que relacionaram a expressão do PD-1 à indução por receptores de antígenos de linfócitos T e B e associaram isso à inibição das respostas imunes [240]. Inclusive, a deficiência do PD-1 foi relacionada ao desenvolvimento de fenótipos autoimunes em modelos de camundongos [241, 242]. Há evidências que demonstram que o PD-1 é necessário para evitar a exaustão terminal das células T, e que sua ausência leva as células T a uma forma terminalmente esgotada e incapaz de serem recuperadas [243]. As células T exauridas (Tex) constituem uma população heterogênea de células antígeno-específicas, em que a expressão de receptores coinibitórios contribui para seu estado disfuncional no contexto de infecções agudas e crônicas [244].

A caracterização fenotípica das células Tex foi originada a partir de modelos murinos com o objetivo de compreender as diferenças entre as respostas T nas infecções agudas e crônicas pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV). Nesses experimentos, as células T antígeno-específicas oriundas de camundongos infectados com uma cepa crônica de LCMV exibiram níveis mais altos e persistentes de expressão de PD-1 quando comparadas às células T antígeno-específicas retiradas de camundongos infectados com uma cepa aguda de LCMV [245].

Outro estudo demonstrou duas populações diferentes de células T disfuncionais específicas de antígeno identificadas de acordo com o nível de expressão de PD-1. Na população de células T em que a expressão de PD-1 foi intermediária, a função efetora de células T pode ser recuperada bloqueando a via PD-1. Isso contrastou com a população de células T que expressaram altos níveis de PD-1. O bloqueio de PD-1 foi incapaz de resgatar a função efetora dessas células T e, portanto, foram considerados esgotados terminalmente [199]. Além disso, foi demonstrado que o bloqueio da via PD-1 pode reverter funcionalmente a exaustão de células T e melhorar o controle sobre a infecção viral devido ao aumento da proliferação e capacidade de morte de células T CD8+ e produção de citocinas [246]. Esse fato demonstrou um papel importante para a sinalização de PD-1 na contenção de respostas contínuas no contexto de infecção viral crônica ou persistente [247].

Em situações de infecção, peptídeos antigênicos de micróbios são apresentados a células T naive por células apresentadoras de antígeno (APC) sobre complexos MHC. As células T CD4+ reconhecem a molécula MHC classe II e são responsáveis por orquestrar as respostas imunes contra patógenos extracelulares, promover auxílio a células B e ativar células efetoras inatas. Em contraste, as células T CD8+ reconhecem moléculas MHC classe I e exercem atividade citotóxica, tendo como alvo células infectadas por vírus ou células malignas.

Após a célula T receber os sinais primários e secundários via complexo TCR:MHC e via coestimulação, essa célula é considerada ativada, podendo se diferenciar em efetora e de memória (**Figura 10**).

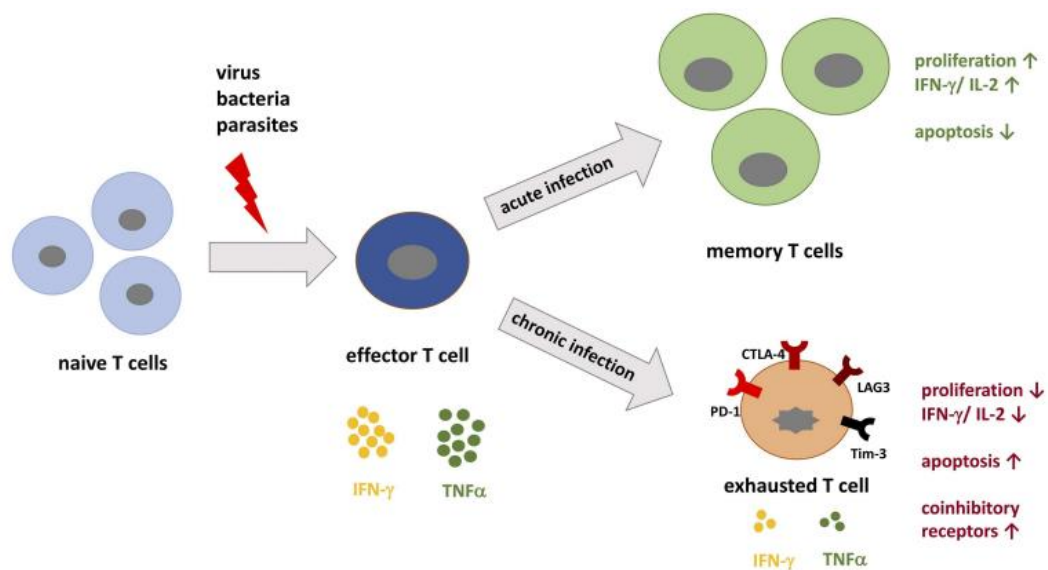


Figura 10. Diferenciação de células T durante infecções agudas vs crônicas. Peptídeos patogênicos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) às células T “naive” durante a infecção. Ativação e diferenciação em células efetoras. Na infecção crônica, a persistência de peptídeos patogênicos leva à estimulação permanente das células T, promovendo a exaustão das células T. A exaustão das células T é em parte definida pela regulação positiva de receptores coinibitórios, como PD-1, LAG-3 e Tim-3. Esses receptores inibem as células T diminuindo a produção de IL-2, a proliferação e o limiar para a apoptose. Fonte: Jubel et al., 2020 [245].

A ativação e a proliferação das células T requer a ligação coestimulatória da molécula CD28 com as moléculas B7-1 ou B7-2 na APC (como apresentado na **Figura 11**).

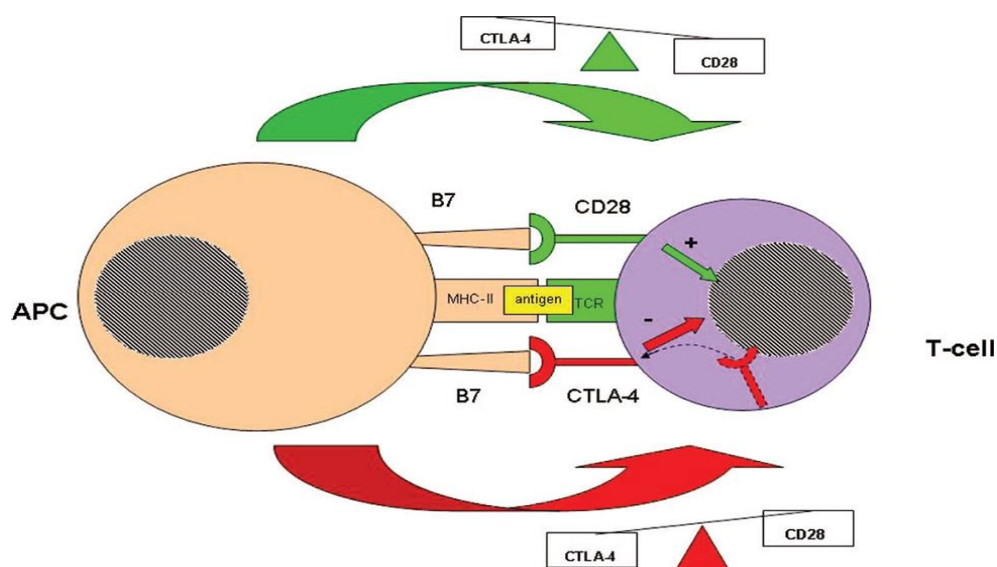


Figura 11. Ativação/inibição de células T. O receptor MHC classe II e o complexo antigênico são apresentados ao TCR. A via de ativação em verde e a via inibitória em vermelho. Abreviações: APC, célula apresentadora de antígeno; CTLA-4, antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; TCR, receptor de células T. Fonte: de la Cruz-Merino et al., 2008 [248].

O PD-1 e seus ligantes são membros da família de receptores B7/CD28/CTLA-4, que são glicoproteínas transmembranares do tipo I que compartilham um padrão estrutural básico. Esse padrão consiste em um domínio extracelular de tipo variável (IgV) de imunoglobulina (Ig), uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática que serve como local de ancoragem para proteínas de sinalização [249, 250].

A molécula PD-1 é codificada pelo gene PDCD1, que contém cinco éxons com diferentes codificações. Por exemplo, os éxons 4 e 5 codificam o domínio citoplasmático, e juntos possuem um motivo inibitório baseado em tirosina imunorreceptor (ITIM) e um motivo de troca baseado em tirosina imunorreceptor (ITSM) [239]. Como ilustrado na **Figura 12**, esses domínios intracelulares ITIM ou ITSM são capazes de recrutar proteínas do tipo SHP e outros adaptadores capazes de interferir nos sinais positivos do receptor de células T (TCR) e em moléculas coestimulatórias como CD28 [251]. A molécula CD28 fornece sinais coestimulatórios essenciais para ativação e sobrevivência das células T e é a receptora para CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), moléculas expressas na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) [250]. Após o engajamento ao receptor, os resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do PD-1 são fosforilados, resultando no recrutamento de SHP-2, que então atenua intermediários da sinalização [154]. O recrutamento do SHP-2 foi também implicado na desfosforilação do CD28 como um mecanismo principal, através do qual PD-1 promove a exaustão de células T [252].

### a ITIM/ITSM inhibition

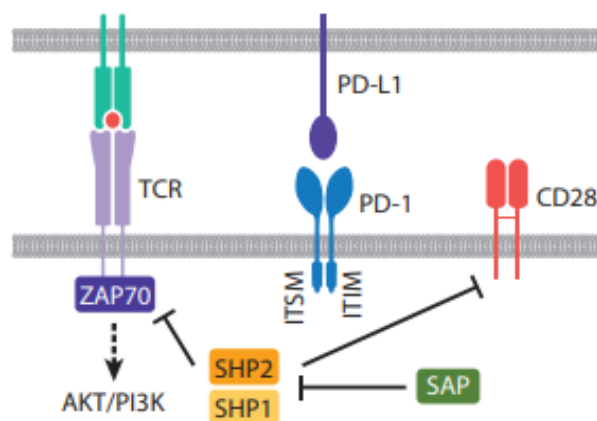


Figura 12. Exaustão de células T pelo CD28 durante infecção crônica-viral e câncer. Fonte: McLane et al., 2019 [154].

Os efeitos inibitórios do PD-1 são mediados pelo engajamento com seus ligantes PD-L1 (CD274, também conhecido como B7-H1) e PD-L2 (CD273, também conhecido como B7-DC) [253]. As interações do PD-1 com seus ligantes podem induzir tolerância imunológica hepática através da indução de apoptose ou disfunção das células T. O PD-L2 é indutivamente expresso por células dendríticas (DCs), macrófagos e mastócitos derivados de medula óssea cultivados. O PD-L1 é expresso constitutivamente em células hematopoiéticas, incluindo células T, células B, macrófagos, células dendríticas (DCs) e mastócitos, além de células de tecido saudável não hematopoiético, incluindo hepatócitos, células endoteliais vasculares e queratinócitos [154]. Embora haja sobreposição entre a ativação de PD-1 via PD-L1 e PD-L2, há evidências para apoiar que essas moléculas regulam as respostas T de forma independente. Por exemplo, estudos apoiam o PD-L2 como o regulador predominante da proliferação de células T CD8+, e o PD-L1 como um importante atuante para a indução de células Treg periféricas [245, 254].

O envolvimento de PD-1 com seus ligantes demonstrou inibir a sinalização proximal do TCR e as respostas subsequentes. A ligação de PD-L1 ou PD-L2 ao seu receptor PD-1 resulta na fosforilação dos motivos de tirosina ITSM e ITIM do PD-1, que estão localizados em seu domínio citoplasmático. A fosforilação leva ao recrutamento subsequente da fosfatase SHP-2, uma proteína tirosina fosfatase (PTP) que demonstrou atenuar diretamente a sinalização do TCR. As PTPs funcionam para desfosforilar quinases e, como consequência, os sinais positivos subsequentes da ativação de TCR e CD28 se tornam antagonizados. Por fim, ocorre a redução da proliferação e a promoção da exaustão das células T, além do aumento da apoptose. Funções efetoras, como a produção de citocinas e a atividade citolítica, também são reduzidas [245, 255].

Além disso, através da via PD-1, sinais inibitórios, como PD-L1 e PD-L2, controlam a indução e manutenção da tolerância a autoantígenos [256]. Um mecanismo pelo qual a via PD-1 pode regular a autorreatividade é através da indução de células Treg na circulação periférica. Isso contrasta com as células Treg naturais, que são derivadas centralmente através da seleção tímica e expressam o fator de transcrição FOXP3 [257]. Tanto as células Treg naturais quanto as induzidas atuam para suprimir a resposta imune produzindo moléculas imunomoduladoras, como as citocinas anti-inflamatórias, TGF $\beta$  e IL-10 [258]. As células Treg ativadas expressam níveis mais altos de PD-1, que se acredita contribuir para a sua atividade. Consistente com isso, o bloqueio de PD-1 leva à diminuição da atividade supressora das células Treg in vivo [259]. Supõe-se que a indução de células Treg periféricas reduza tanto a ativação quanto a atividade efetora de células T CD4+ e CD8+ autor reativas. Juntos, esses dados ressaltam a complexidade do envolvimento do PD-1 e os papéis exclusivos que a via PD-1 desempenha no contexto de

infecção e autoimunidade. Assim, muito provavelmente a via PD-1 funcione para reduzir a ativação de células T auto reativas, bem como modular o grau de ativação e a atividade efetora de células T específicas do antígeno [260; 261].

### 2.12.1 *PD1 na HCV*

Na hepatite C crônica, o estímulo antigênico persistente induz a regulação positiva e sustentada de moléculas coinibitórias de checkpoint imune e seus ligantes cognatos. Isso difere da infecção aguda, onde a carga de antígeno é temporária e a expressão, transitória. Na infecção crônica, ocorre uma disfunção efetora antiviral nas células T antígeno-específicas. Essas células se tornam incapazes de montar ou sustentar respostas robustas, como redução da produção de IL-2 e outras citocinas e ocorre redução da capacidade proliferativa e citotóxica. A expressão de moléculas ligadas à superfície celular, como o PD-1, nas células T antígeno-específicas, constitui um marcador de exposição contínua a estímulos imunogênicos [260, 262].

Na hepatite C crônica, a expressão de PD-1 é contínua e se apresenta em níveis elevados nos linfócitos T CD8+ exauridos (Tex) [263]. Também foi demonstrada a expressão aumentada desta molécula em células T intra-hepáticas, estando positivamente associada à exaustão destas células [250].

Embora na hepatite C crônica o principal gatilho para a expressão de PD-1 nas células T seja o engajamento do TCR com a molécula MHC contendo o epítipo da célula infectada, um microambiente adequado de citocinas que consista em mediadores pró-inflamatórios como IFN $\gamma$ , interferons tipo 1, IL6, VEGF e IL2, aumenta a ativação dessa via de checkpoint imunológico. Além disso, citocinas importantes para a manutenção de células T, como a IL7 e IL5, e TGF $\beta$ , que potencializa a atividade regulatória das células T, também contribuem para a expressão de PD-1 durante a doença crônica [264].

Na hepatite C crônica, a defesa imune do hospedeiro depende da interação entre as respostas imunes inata e adaptativas, sendo esta essencial para o sucesso do controle da infecção. O RNA do vírus e suas proteínas participam ativamente no reconhecimento imune pelo hospedeiro. Inicialmente, o HCV ativa o TLR3 através de sinais de proteína quinase R dependente de RNA (PKR) e gene I induzível por ácido retinóico (RIG-I). Posteriormente, os sinais são transmitidos via proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS), induzindo os IFNs e Toll-IL-1 (TRIF). De fato, a protease NS3/4A do HCV pode inativar eficientemente MAVS e TRIF, bloqueando o IFN $\beta$  e a indução de genes estimulados por interferon (ISG) [250].

Vários estudos foram realizados para avaliar o efeito do bloqueio da via PD-1/PD-L1 em condições de hepatite viral e CHC. Estudos com foco na hepatite C crônica, realizado por Penna e colaboradores [265] e Radziewicz e colaboradores [266], mostraram que a regulação positiva de PD-1 afeta células T CD8 + específicas de HCV no sangue periférico e no compartimento intra-hepático durante a infecção crônica pelo HCV. Além disso, o bloqueio da interação PD-1 / PD-L1 mostrou melhorar a capacidade de expansão e secreção de IFN $\gamma$  das células T CD8 + específicas do HCV [267, 268]. Ademais, Fuller e colaboradores [198] mostraram como o bloqueio de PD-1 poderia controlar a replicação do HCV em um modelo de chimpanzé de hepatite C crônica. Curiosamente, o chimpanzé com infecção controlada também apresentou uma resposta de imunidade de base mais ampla do que os animais da coorte que não responderam, sugerindo que o tratamento anti-PD-1 pode ser útil apenas nos casos com um limiar crítico de HCV pré-existente células T CD8 + específicas.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo avaliar aspectos histológicos e imuno-histoquímicos da resposta tecidual em amostras de explante hepático de pacientes com hepatite C (HCV) crônica comparando o grupo de casos submetidos a tratamento antiviral com DAA com um grupo controle de pacientes não tratados HCV+.

Assim, buscamos abordar os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar de modo semiquantitativo a distribuição dos principais marcadores histológicos de lesão hepática.
2. Avaliar de modo semiquantitativo os diversos tipos de respostas da célula progenitora hepática (CPH) evidenciados através da reatividade para CK7 e comparar com cada um dos marcadores histológicos de lesão hepática.
3. Avaliar de modo quantitativo, na região da interface perisseptal, a expressão dos linfócitos B CD20+, T CD3+, T CD4+ e T CD8+, e compará-la com cada um dos marcadores histológicos de lesão hepática.
4. Avaliar de modo quantitativo, na região da interface perisseptal, e de modo semiquantitativo nas regiões septal e centrolobular, a expressão da molécula coestimulatória negativa do checkpoint imune PD-1 e do fator de transcrição FOX-P3 e comparar a expressão com cada um dos marcadores histológicos de lesão hepática.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Seleção da Amostra

O universo do presente estudo compreende 152 pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica submetidos a transplante hepático no Serviço de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia HC-FMUSP, no período entre 2016 e 2021.

A seleção dos casos utilizados no trabalho foi baseada nos seguintes critérios:

#### a) Critérios de inclusão

- Infecção crônica pelo HCV, diagnosticada por um teste sorológico e um teste confirmatório (reação em polimerase em cadeia – PCR e carga viral);
- Diagnóstico clínico de cirrose;
- Transplante hepático realizado no Serviço de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia HC-FMUSP.

#### b) Critérios de exclusão

- Dados clínicos e demográficos incompletos ou inconsistentes nos prontuários médicos;
- Indisponibilidade de amostras anatomopatológicas representativas de tecido hepático não tumoral na Divisão de Anatomia Patológica - HC-FMUSP;
- Diagnóstico de quaisquer outros distúrbios que acometam o fígado, incluindo doença autoimune, coinfeção por vírus da hepatite B (VHB) ou vírus da imunodeficiência humana (HIV), exceto doença hepática gordurosa não alcoólica e alcoólica;
- Amostras obtidas em retransplantes;
- História de doença neoplásica com acometimento hepático, exceto carcinoma hepatocelular (CHC);
- Detecção, no explante, de mais de três lesões de CHC e/ou presença de neoplasia em ambos os lobos.

Assim, como exposto na **Figura 13**, a partir do universo de 152 casos de transplante em pacientes diagnosticados com VHC, respeitados os critérios de inclusão e exclusão, a casuística do presente estudo é de 42 pacientes.

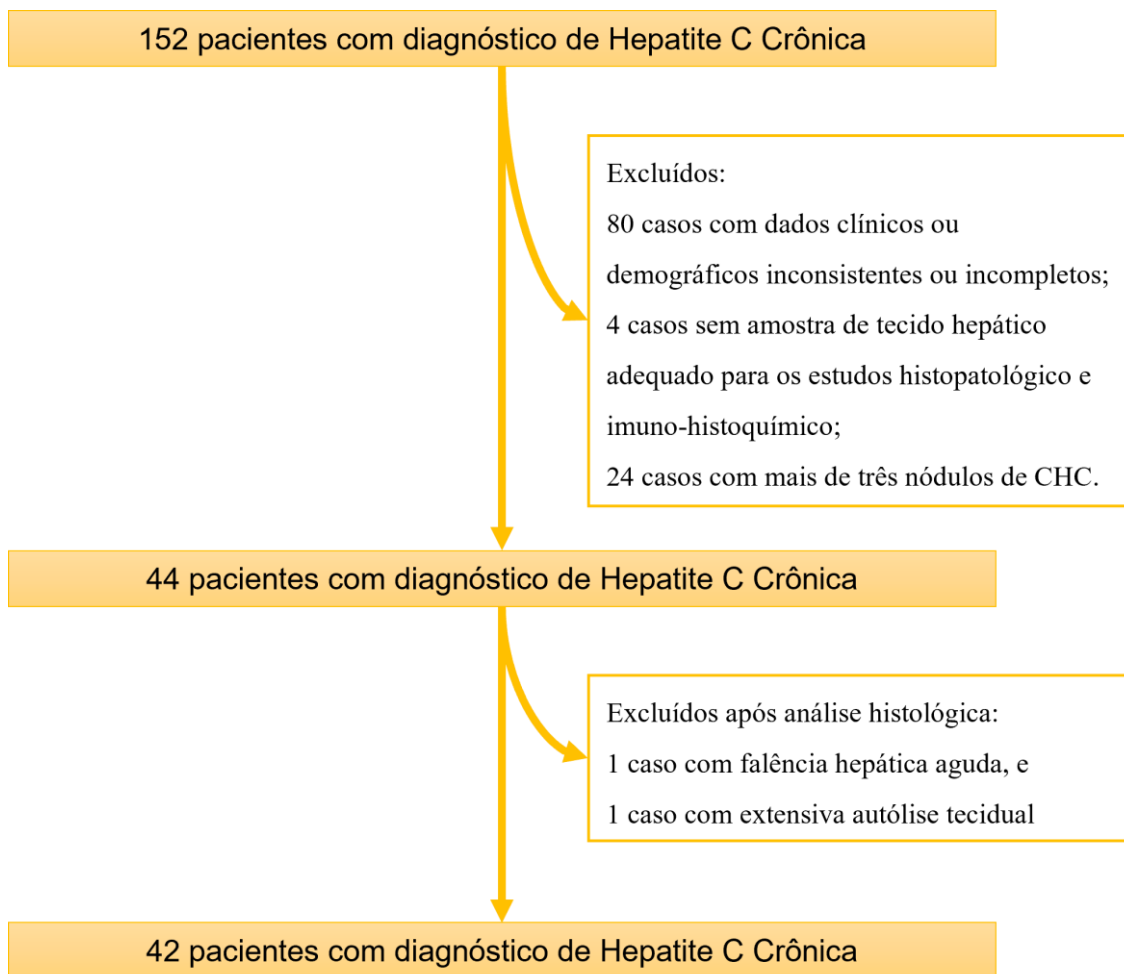


Figura 13. Fluxograma da seleção da amostra. Abreviatura: CHC, carcinoma hepatocelular. Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.1 Estratificação da Amostra

Os 42 casos foram divididos em dois grupos, de acordo com o tratamento antiviral e o status da carga viral:

- a) Grupo tratado - Pacientes submetidos a tratamento antiviral com DAA com níveis indetectáveis de RNA de HCV no soro por técnica de PCR: 22 indivíduos

Esse grupo foi composto por 22 pacientes, sendo 9 com diagnóstico apenas de hepatite C crônica tratada e 13 com diagnóstico de hepatite C crônica tratada e CHC associado.

- b) Grupo não tratado – Pacientes não submetidos a tratamento antiviral: 20 pacientes com sorologia positiva para HCV, definida por detecção de anticorpos anti-HCV por teste ELISA de 3ª geração e por detecção de RNA viral por técnica de PCR.

Esse grupo foi composto por 5 pacientes com diagnóstico apenas de hepatite C crônica com persistência do HCV e 15 com persistência do HCV e CHC associado.

Todas as amostras hepáticas dos explantes dos 42 pacientes foram igualmente submetidas às análises histológicas e imuno-histoquímicas, independente do status do tratamento antiviral.

Todos os pacientes do estudo apresentavam valor de gravidade do MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*) indicativo de transplante hepático. Foram apenas três pacientes com MELD entre 6 e 9, 27 com MELD entre 10 e 20, cinco entre 20 e 30, e sete acima de 30.

As informações clínicas e dados demográficos, como gênero, idade no transplante, genótipo viral, carga viral no pré-transplante, histórico de tratamento, data do início e término do tratamento com DAA, data do transplante foram obtidos do prontuário dos pacientes (dados apresentados no **Anexo A**).

Os informes macroscópicos e as designações das amostras histológicas foram obtidos mediante análise retrospectiva dos laudos anatomopatológicos dos explantes. A partir daí, foi selecionado um cassete de parafina considerado representativo para cada caso. Com o intuito de minimizar potenciais efeitos da terapia locorregional ou compressão tumoral no tecido, quando o paciente apresentava CHC associado, foi selecionado o bloco representando a região mais distante do tumor, sendo a amostra estudada sempre representativa do lobo oposto ao da neoplasia.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo de pesquisa número: 1.889.612.

#### 4.2 Avaliação histológica

Os preparados histológicos de tecido hepático, embebidos em parafina, das 42 amostras selecionadas, foram submetidos a microtomia para obtenção de cortes histológicos com 4 micrômetros de espessura. Os estudos histopatológicos foram realizados com as colorações histoquímicas hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson para análise da matriz extracelular e método de Perls para detecção de pigmento de hemossiderina no tecido.

Inicialmente, a avaliação histológica foi realizada individual pela médica patologista autora desta tese (APFP). Posteriormente, essa avaliação foi validada junto a um patologista experiente em patologia hepática, orientador desta tese (VAFA). Toda a análise foi realizada de maneira cega quanto aos demais dados clínicos e laboratoriais do paciente e seguindo os critérios pré-definidos:

#### *4.2.1 Análise da atividade necroinflamatória*

Para esta análise, utilizamos o sistema de graduação semiquantitativo para classificação necroinflamatória propostos por Ishak e colaboradores [98], versão aprimorada do escore de Knodell [97].

As variáveis desta classificação foram assim avaliadas:

a) Inflamação portal e septal. Os escores variaram de 0 a 4, de acordo com a seguinte graduação:

0 - ausente;

1 - discreta, em alguns ou todos os espaços porta (EP) ou septos;

2 - moderada;

3 - moderada ou marcada, em alguns ou todos os EP ou septos;

4 - acentuada, em todos EP ou septos.

b) Hepatite de interface perisseptal. Os escores variaram de 0 a 4, de acordo com as seguintes especificações:

0 - ausente;

1 - discreta, focal em poucas regiões;

2 - discreta a moderado, focal na maioria das regiões;

3 - moderada, contínua, em menos que 50% das regiões;

4 - acentuada, contínua, em mais de 50% das regiões.

c) Necrose lítica focal/apoptose. Os escores variaram de 0 a 4, de acordo com os seguintes critérios observados em objetiva de 10x, avaliando-se a média em cinco campos aleatórios:

- 0 - ausente;
- 1 - 1 foco ou menos;
- 2 - 2 a 4 focos;
- 3 - 5 a 10 focos;
- 4 - mais de 10 focos.

d) Necrose confluyente. Os escores variaram de 0 a 6, de acordo com as seguintes especificações:

- 0 – ausente;
- 1 – focal;
- 2 – algumas áreas em zona 3;
- 3 – maioria das áreas em zona 3;
- 4 – necrose em ponte em zona 3;
- 5 – necrose em ponte múltipla em zona 3;
- 6 – necrose pan-acinar.

#### 4.2.2 *Análise da alteração arquitetural*

##### 4.2.2.1 *Fibrose*

Para a análise do grau de alteração estrutural/fibrose, utilizamos o escore de fibrose de Ishak e colaboradores [98].

- 0 - fibrose ausente;
- 1 - expansão fibrosa de algumas áreas portais;
- 2 - expansão fibrosa da maioria das áreas portais;
- 3 - expansão fibrosa da maioria das áreas portais, com ocasionais pontes fibrosas;
- 4 - expansão fibrosa das áreas portais, com formação de frequentes pontes fibrosas;
- 5 - formação frequente de pontes fibrosas com cirrose incompleta;
- 6 - cirrose provável ou definitiva.

Todas as 42 amostras foram submetidas a análise histológica para confirmação do estadiamento como categoria 6 do escore de pontuação de fibrose de Ishak [98], ou seja, cirrose provável ou definitiva.

#### 4.2.2.2 Estadiamento da cirrose

As amostras foram classificadas em três categorias, com base na largura dos septos fibrosos e no tamanho dos nódulos, conforme proposto por Kim et al. [108] em nome da *Laennec Liver Society*:

- A - cirrose inicial, com grandes nódulos cirróticos circundados por septos fibrosos finos;
- B - cirrose intermediária, com nódulos cirróticos circundados por septos fibrosos relativamente espessos;
- C - cirrose avançada, com pelo menos um septo muito espesso ou com muitos micronódulos.

Nos casos com grande heterogeneidade dos septos fibrosos, o estadiamento definido foi baseado no subtipo predominante de cirrose (acima de 50% da área representada).

#### 4.2.2.3 Achados de regressão da fibrose

A análise da regressão da fibrose foi realizada como descrito previamente por Putra et al. [5]. A evidência de regressão foi definida pela presença de septos fibrosos interrompidos, avaliados em lâminas coradas pela coloração de tricrômico de Masson. Septo fibroso interrompido foi definido como um septo incompleto com uma lacuna visível na faixa de tecido fibroso.

A pontuação semiquantitativa foi determinada, com escore variável de 0 a 3, conforme descrito a seguir:

- 0 – ausência de evidências de regressão;
- 1 – evidências de regressão envolvendo menos de 33% dos septos fibrosos;
- 2 – evidências de regressão envolvendo de 33% a 66% dos septos fibrosos;
- 3 – evidências de regressão envolvendo acima de 66% dos septos fibrosos.

### 4.2.3 *Análise dos achados relacionados a doença gordurosa hepática*

#### 4.2.3.1 *Esteatose*

A esteatose macrogoticular identificada nos hepatócitos foi estimada em percentuais em acordo com os seguintes intervalos de categorização propostos por Kleiner et al. (2005):

grau 0 – ausente ou acometendo menos de 5 % dos hepatócitos;

grau 1 – acometimento em menos de 33% dos hepatócitos;

grau 2 – acometimento de 33% a 66% dos hepatócitos;

grau 3 – acometimento de mais de 66% dos hepatócitos.

#### 4.2.3.2 *Balonização hepatocelular*

Hepatócitos foram definidos como “balonizados” quando maiores que os adjacentes, com forma globosa e citoplasma amplo, pálido e tumefeito.

A presença de hepatócitos balonizados foi categorizada com os escores:

0 – ausente ou mínima;

1 – presente, moderada;

2 – acentuada.

#### 4.2.3.3 *Esteato-hepatite*

O diagnóstico de esteato-hepatite foi categorizado com os escores:

0 – ausente;

1 – presente.

### 4.3 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos de 3 micrômetros de espessura foram obtidos em lâminas preparadas previamente com solução adesiva 3 *amino-propyltriethoxy-silane* (Sigma Aldrich, Estados Unidos) a 5% e incubadas em estufa a 50°C por 12 horas. A desparafinação das amostras ocorreu em dois banhos de xilol (Alkimia, Brasil), um a 56°C por 30 minutos e outro a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram hidratadas em etanol (Dinâmica, Brasil) com concentração decrescente: absoluto (4 banhos), 80% (1 banho) e água corrente e destilada.

Para as reações, foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3: clone 2GV, pré-diluído (Ventana/Roche, Suíça); CD20: clone L26, pré-diluído (Ventana/Roche, Suíça); CD4: clone 4B12, pré-diluído (Dako, Dinamarca); CD8: clone C8-144B, pré-diluído (Dako, Dinamarca); PD1: clone EP239, diluição 1:200 (Cell Marque); FOXP3: clone 236A/E7, diluição 1:100 (Abcam, USA); e CK7, clone SP52, pré-diluído (Ventana/Roche, Suíça).

Todas as reações foram realizadas com controles positivos referentes a cada anticorpo e um controle negativo, onde a etapa de incubação com o anticorpo primário foi substituída pela aplicação somente do diluente de anticorpo, soro fetal bovino (BSA) (Sigma Aldrich, USA). As demais etapas foram idênticas às das demais reações.

A reativação antigênica foi realizada em panela elétrica a vapor por 35 minutos com solução de reativação tampão Citrato (pH 6,0) *Novolink Max Polymer* (Leica Biosystems, Alemanha) para o FOXP3 e solução tampão Tris (pH 9,0) *Novolink Max Polymer* (Leica Biosystems, Alemanha) para os demais anticorpos. Após esse processo, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos e depois lavadas em água corrente e água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 20 volumes (Dinâmica, Brasil) e álcool metílico (Alkimia, Brasil) na proporção 1:1 por três vezes, 20 minutos cada incubação. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente e tampão fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4 (LGC Biotecnologia, Brasil). Uma etapa de bloqueio de ligações inespecíficas com o reagente *Cas Block* (Invitrogen, Inglaterra) foi realizada com incubação de 10 minutos a 37°C. Após a retirada do bloqueador, as amostras foram submetidas à incubação com os respectivos anticorpos primários a 37°C por 30 minutos e, após, a 4°C por 12 horas.

Em seguida, as amostras foram submetidas a lavagem com tampão PBS (LGC Biotecnologia, Brasil) três vezes, 5 minutos cada lavagem. Uma segunda incubação foi realizada com o anticorpo secundário IgG de coelho anticamundongo (Leica Biosystems, Alemanha) a 37°C por 30 minutos. As amostras foram novamente lavadas com PBS 0,01M pH 7,4 (LGC Biotecnologia, Brasil) três vezes com duração de 5 minutos cada. Uma terceira incubação, agora com anticorpo IgG anticoelho conjugado com a enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP) *Novolink Max Polymer DS* (Leica Biosystems, Alemanha) foi realizada a 37°C por 30 minutos. Após, as amostras foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,4 (LGC Biotecnologia, Brasil) três vezes com duração de 5 minutos cada.



A revelação da reação foi feita com uma solução composta por: 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich, USA), dimetilsulfóxido (1ml) e peróxido de hidrogênio 20% (1ml) com incubação a 37°C por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram mais uma vez lavadas com PBS 0,01M pH 7,4 (LGC Biotecnologia, Brasil) e contracoradas com Hematoxilina de Harris (Sigma Aldrich, USA), por 45 segundos. Após, as amostras foram lavadas em água corrente e mergulhadas em água amoniacal 0,5% por 5 segundos e novamente lavadas em água corrente. Foi realizada a desidratação progressiva das amostras com etanol 50%, 80% e 100%, diafanização em xilol e montagem das lâminas com *Entellan* (Sigma Aldrich, Canadá).

#### 4.3.1 Avaliação da reatividade para citoqueratina 7 (CK7)

Além dos ductos originais, a reação imuno-histoquímica para detecção de CK7 identificou estruturas caracterizadas por expressarem respostas iniciais da célula progenitora hepática (CPH). Tais estruturas foram definidas de acordo com a nomenclatura proposta por Roskams et al. [13], com modificações, como células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI), e reação ductular (RD).

As CPIs se caracterizaram como pequenas células cuboidais, isoladas, com núcleos ovais, escasso citoplasma e de forte e homogênea coloração de citoplasma e membrana para CK7. As EDIs se caracterizaram como cordões de células cuboidais, formando ductulos irregulares, sem lúmens visualizados e por vezes colapsados, de forte e homogênea coloração de citoplasma e membrana para CK7. A RD se caracterizou como cordões regulares de células cuboidais, formando estruturas tubulares, com lúmens bem visualizados, de forte e homogênea coloração de citoplasma e membrana para CK7.

As estruturas descritas acima estão exemplificadas na **Figura 14**.

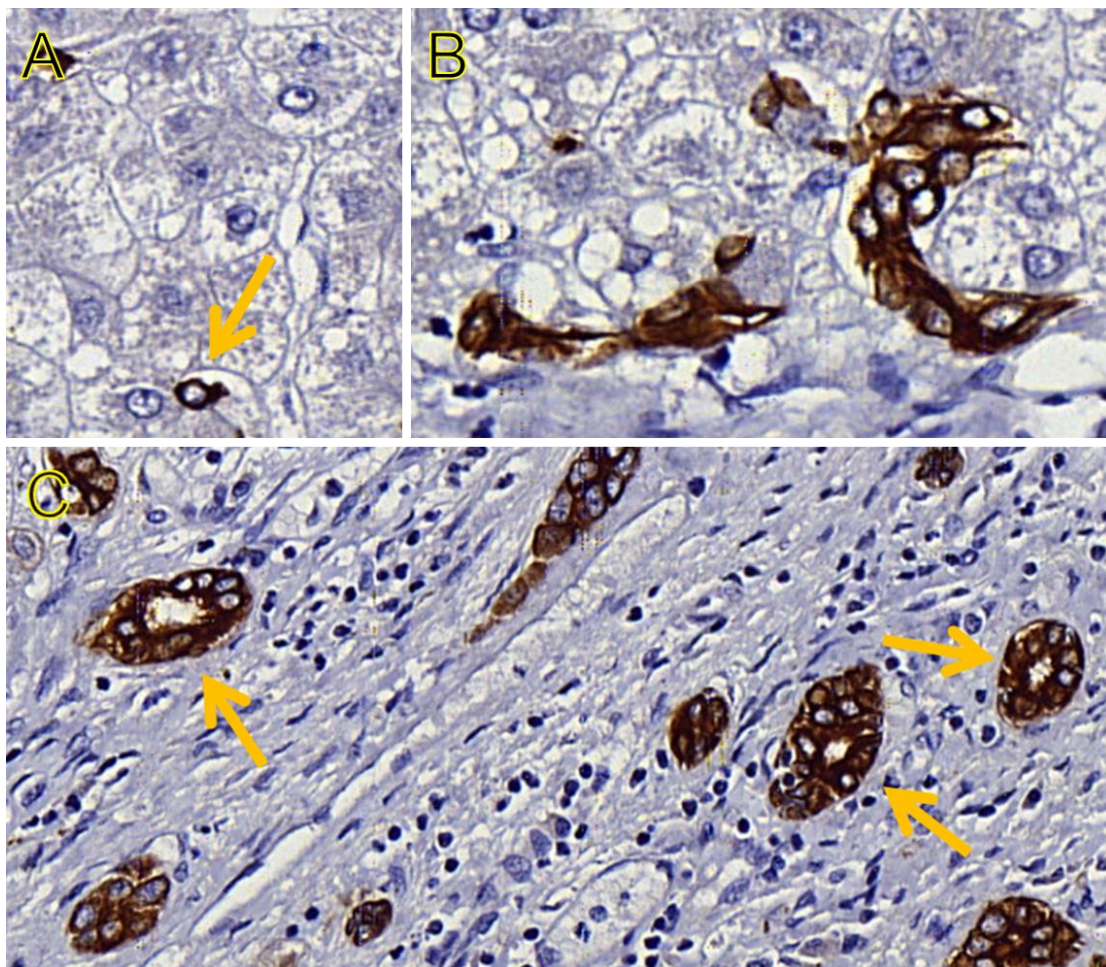


Figura 14. Exemplificação de estruturas positivas para CK7. (A) Célula progenitora isolada (CPI, seta); (B) Estrutura ductular isolada (EDI); (C) Reação ductular (RD, setas). Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.3.1.1 *Análise das respostas iniciais da CPH sob a forma de células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI)*

##### 4.3.1.1.1 *Análise semiquantitativa da reatividade para CK7 em CPI e EDI*

A análise das CPI e EDI ocorreu em diferentes etapas, e seguiu os seguintes critérios: CPI e EDI foram observadas na zona 1 (em torno a placa limitante) e zonas 2 e 3 combinadas (região centrolobular).

A semiquantificação foi realizada separadamente, para cada uma das estruturas (CPI e EDI), como descrito previamente por Delladetsima e colaboradores [135] e Gouw e colaboradores [269], com modificações, nas diferentes regiões do parênquima:

a) Zona 1 (em torno à placa limitante). O escore variou de 0 a 2 conforme as seguintes definições:

Grau 0 – ausente;

Grau 1 – até 10 CPIs ou EDIs positivas para CK7 em mais de 1 septo;

Grau 2 – acima de 10 CPIs ou EDIs em mais de 1 septo.

b) Zonas 2 e 3 combinadas (centrolobular). O escore variou de 0 a 2 conforme as seguintes definições:

Grau 0 – ausente;

Grau 1 – até 10% de CPIs ou EDIs positivas para CK7 em pelo menos 1 ácino;

Grau 2 – acima de 10% de CPIs ou EDIs positivas para CK7 em pelo menos 1 ácino.

#### *4.3.1.1.2 Escore Unificado*

O grau obtido na zona 1 (0-2) foi somado ao grau obtido nas zonas 2 e 3 combinadas (0-2), resultando em um escore unificado para CPI e em um escore unificado para EDI, ambos variando de 0 a 4.

#### *4.3.1.1.3 Escore Final representativo da CPH*

Finalmente, a soma dos escores unificados obtidos para CPI e EDI resultou no escore final representativo do grau de ativação “global” da célula progenitora hepática (CPH). Este escore variou de 0 a 8, conforme as seguintes definições:

0-4 – baixa ativação de CPH;

5-8 – alta ativação de CPH.

Assim, conforme exposto na **Figura 15**, foi obtido o grau de ativação “global” da CPH.

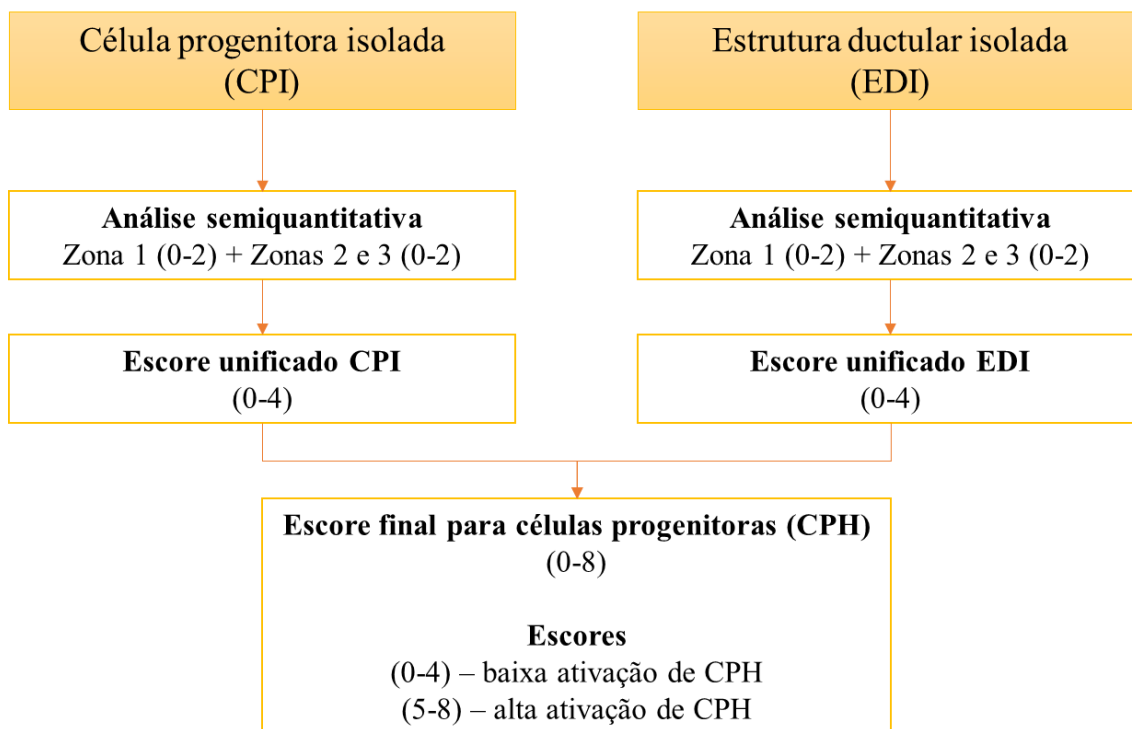


Figura 15. Fluxograma das etapas para determinação do escore final de ativação das células progenitoras hepáticas (CPH). Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.3.1.3 Semiquantificação da reatividade para CK7 na reação ductular (RD) em torno à placa limitante

A reação ductular (RD) foi observada no interior e predominantemente na margem dos septos fibrosos (zona 1), como apresentada previamente na **Figura 14**.

A semiquantificação se baseou no método proposto por Libbrecht et al. [16], com modificações. Foi utilizada uma escala de escores variáveis de 0 a 3 com base na extensão em torno à placa limitante, de acordo com as seguintes definições:

Grau 0 – ausente;

Grau 1 – RD focal descontínua;

Grau 2 – extensão intermediária da RD;

Grau 3 – RD contínua em acima de 50% dos septos.

#### 4.3.2 Avaliação dos achados imuno-histoquímicos na resposta linfocitária

Todas as análises foram realizadas de acordo com critérios pré-determinados, desconhecendo-se o status do tratamento ou quaisquer outras variáveis clínicas ou histológicas.

##### 4.3.2.1 Quantificação por análise de imagem em método semiassistido

Para a quantificação da expressão de CD3+, CD20+, CD4+ e CD8+ nos linfócitos da região da interface septal, as lâminas coradas com amostras de cirrose hepática foram digitalizadas com ampliação de 40×, usando um scanner de lâmina inteira Panoramic 250 (3DHitech, Budapeste, Hungria) na Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Após este processo, as lâminas digitalizadas foram analisadas em toda sua extensão utilizando-se o software QuPath (versão 0.3.0; Centro de Pesquisa do Câncer e Biologia Celular, Universidade de Edimburgo, Edimburgo, Escócia), uma plataforma de análise de imagem de código aberto [270].

Para cada lâmina digitalizada, de 10 a 12 campos não coincidentes foram escolhidos da região da interface para análise, sem seleção de *hotspot* (**Figura 16**). Regiões com tecido fibroso, áreas de artefato devido a dobras, fragmentação de tecido ou coloração irregular, foram identificados manualmente e evitados. Em seguida, o programa, realizou de forma automatizada, uma série de avaliações: análise vetorial de coloração; detecção total da área tecidual; e detecção celular. Em uma etapa seguinte, nós estabelecemos o limite de positividade (determinação de *threshold*) para cada marcador por tentativa e erro para correta detecção de células positivas. Por garantia, as células positivas foram submetidas à validação por dois médicos patologistas (APFP e VLC) antes de serem aplicadas ao processo computacional. Ao final da quantificação, os dados gerados no QuPath continham o número de células positivas por mm<sup>2</sup> de tecido e sua respectiva representação de % de células positivas, que foram exportados para o Excel. Para cada uma das amostras, foi obtida a média entre cada um dos diferentes campos selecionados e esse valor foi então atribuído como o valor de células positivas por mm<sup>2</sup> para cada uma das amostras.

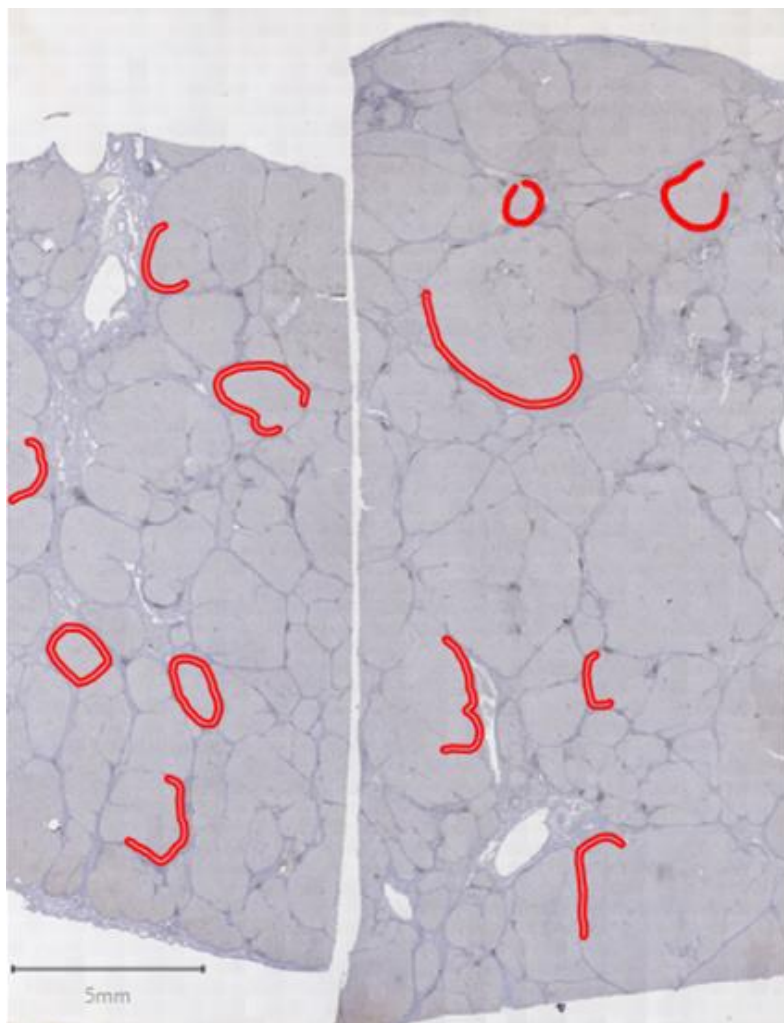


Figura 16. Exemplo da seleção dos diferentes campos representativos da interface perisseptal em uma amostra para quantificação no software QuPath. Fonte: Elaborada pela autora.

A mediana obtida ao final das análises foi utilizada como medida para separar os pacientes em baixa e alta expressão para cada um dos marcados, ou seja, os que apresentaram número de células positivas/mm<sup>2</sup> abaixo da mediana foram agrupados em “baixa expressão” e, aqueles com número de células positivas/mm<sup>2</sup> acima da mediana, foram agrupados em “alta expressão”.

Não foi observada a quantidade mínima de células imunomarcadas (< 0,1% células positivas) para a molécula coestimulatória negativa do checkpoint imune PD1 e para o fator de transcrição FOXP3, impossibilitando a quantificação pelo software QuPath.

#### 4.3.3 Avaliação semiquantitativa da expressão de PD-1+ e FOX-P3

A análise semiquantitativa da expressão do PD-1 e FOX-P3 nos linfócitos foi realizada separadamente nas regiões septal e centrolobular. Para essa análise, foram obedecidos os seguintes critérios de avaliação:

Grau 0 – células ausentes ou escassas e isoladas;

Grau 1 – poucas células por vezes agrupadas.

#### 4.4 Análise estatística

Em nosso estudo, utilizamos testes estatísticos não paramétricos devido às características de distribuição de nossos dados (distribuição não normal, para dados quantitativos). Os testes estatísticos aplicados para análise de associação entre as variáveis estudadas foram teste qui-quadrado de Pearson, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e correlação de Spearman. Utilizamos o software estatístico IBM SPSS (versão 22; Armonk, NY, EUA) e o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

A amostra estudada foi constituída por explantes hepáticos de 42 indivíduos com diagnóstico de hepatite C crônica, divididos em dois grupos. O grupo de pacientes tratados com sucesso DAAs foi composto por 22 pacientes (52,4%) e o grupo de não tratados, com infecção ativa pelo HCV+, foi composto por 20 pacientes (47,6%).

Nossa coorte foi constituída por 28 indivíduos do sexo masculino (66,7%) e 14 do sexo feminino (33,3%). A idade média foi 55 anos, variando de 38 a 71 anos. Quanto ao genótipo, 33 indivíduos apresentaram genótipo 1 (78,6%) e apenas nove apresentaram genótipo 3 (21,4%), sendo quatro no grupo tratado e cinco no grupo não tratado. Havia sete casos com histórico de consumo de álcool associado: três no grupo que recebeu tratamento antiviral; e quatro entre os não tratados.

Assim, devido à pequena quantidade de indivíduos com genótipo 3 e ao pequeno número de pacientes com histórico de consumo de álcool, não realizamos uma análise entre essas informações e as demais variáveis estudadas neste trabalho.

### 5.2 Avaliação Histológica

O **Anexo B** apresenta os graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas em cada um dos 42 casos.

A **Tabela 1** apresenta a distribuição das variáveis histopatológicas e a comparação desta distribuição entre os dois grupos de pacientes.



**Tabela 1.** Dados comparativos das avaliações histopatológicas (Qui-quadrado)

Característica	Pacientes tratados com DAA-RSV+		Pacientes não tratados-HCV+		P
	N	%	N	%	
<b>Inflamação septal</b>					<b>0,027</b>
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	8	19,0	1	2,4	
Grau 2	10	23,8	8	19,0	
Grau 3	4	9,5	10	23,8	
Grau 4	0	0,0	1	2,4	
<b>Atividade de interface</b>					<b>0,005</b>
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	10	23,8	0	0,0	
Grau 2	7	16,7	9	21,4	
Grau 3	5	11,9	10	23,8	
Grau 4	0	0,0	1	2,4	
<b>Necrose lítica focal</b>					0,393
Grau 0	1	2,4	0	0,0	
Grau 1	13	31,0	8	19,0	
Grau 2	7	16,7	11	26,2	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Necrose confluyente</b>					0,305
Grau 0	20	47,6	15	35,7	
Grau 1	2	4,8	2	4,8	
Grau 2	0	0,0	2	4,8	
Grau 3	0	0,0	1	2,4	
<b>Estadiamento de cirrose</b>					0,445
A	7	16,7	4	9,5	
B	10	23,8	13	31,0	
C	5	11,9	3	7,1	
<b>Regressão de fibrose</b>					0,914
Grau 0	3	7,1	4	9,5	
Grau 1	7	16,7	7	16,7	
Grau 2	11	26,2	8	19,0	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Esteatose</b>					0,593
Grau 0	19	45,2	15	35,7	
Grau 1	2	4,8	4	7,1	
Grau 2	1	2,4	1	2,4	
Grau 3	0	0,0	0	0,0	
<b>Balonização hepatocelular</b>					0,634
0	19	45,2	15	35,7	
1	2	4,8	3	7,1	
2	1	2,4	2	4,8	
<b>Esteato-hepatite</b>					0,598
Ausente	21	50,0	18	42,9	
Presente	1	2,4	2	4,8	

### 5.2.1 Atividade necroinflamatória

#### 5.2.1.1 Inflamação septal

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, 8 pacientes tratados (19,0%) apresentaram inflamação discreta (grau 1), dez (23,8%), inflamação moderada (grau 2), quatro (9,5%) com grau moderado a marcado (grau 3) e nenhum apresentou inflamação marcada (grau 4).

No grupo de pacientes não tratados, apenas um indivíduo apresentou inflamação septal discreta (grau 1), oito (19%) apresentaram inflamação moderada (grau 2), dez (23,8%) apresentaram grau moderado a marcado (grau 3) e apenas um (2,4%) com inflamação marcada (grau 4).

Tais achados demonstram que a inflamação septal esteve presente em todos os casos, mesmo nos tratados. É importante ressaltar que, mesmo presente, tal inflamação foi significativamente menor nos pacientes tratados ( $p = 0,027$ ; **Tabela 1**).

Exemplos de inflamação septal são apresentados na **Figura 17**.

#### 5.2.1.2 Atividade de interface perisseptal

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, dez pacientes tratados (23,8%) apresentaram atividade de interface perisseptal discreta, focal (grau 1), sete (16,7%), atividade de interface perisseptal discreta a moderada, focal (grau 2), cinco (11,9%) com atividade de interface perisseptal moderada, contínua (grau 3) e nenhum apresentou atividade de interface perisseptal acentuada, contínua (grau 4).

No grupo de pacientes não tratados, nenhum apresentou atividade de interface perisseptal discreta, focal (grau 1), nove pacientes (21,4%) apresentaram atividade de interface discreta a moderada, focal (grau 2), dez (23,8%) apresentaram atividade de interface moderada, contínua (grau 3), e apenas um (2,4%) com atividade de interface acentuada, contínua (grau 4).

Tais achados demonstram que a atividade de interface perisseptal esteve presente em todos os casos, mesmo nos tratados. É importante ressaltar que, mesmo presente, a atividade de interface perisseptal foi significativamente menor nos pacientes tratados ( $p = 0,005$ ; **Tabela 1**).

Exemplos de atividade de interface perisseptal são apresentados na **Figura 18**.

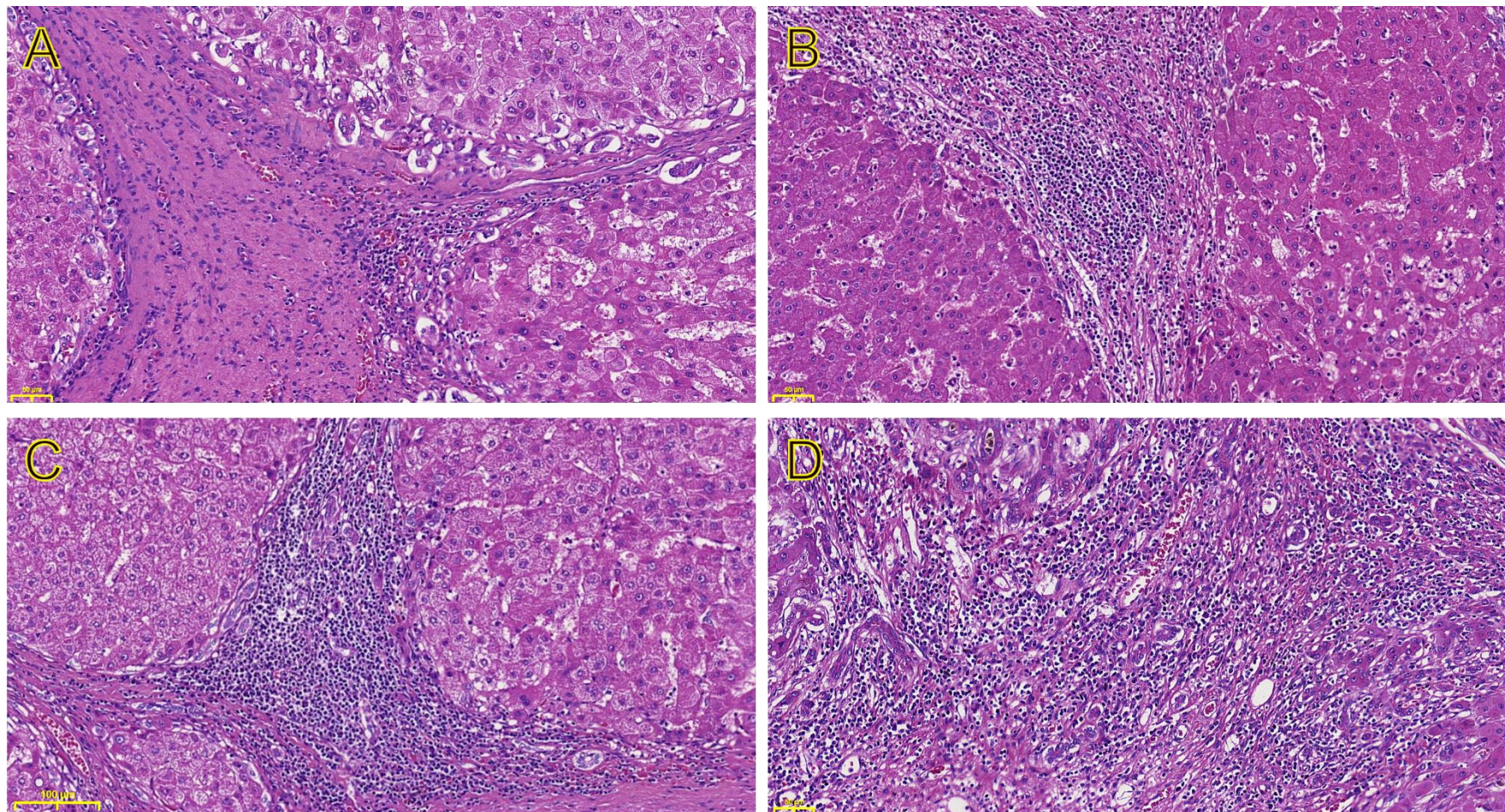


Figura 17. Exemplos dos achados referentes aos diferentes graus de inflamação septal. (A) Grau 1, (B) Grau 2, (C) Grau 3, (D) Grau 4. HE, 20X. Fonte: Elaborada pela autora.

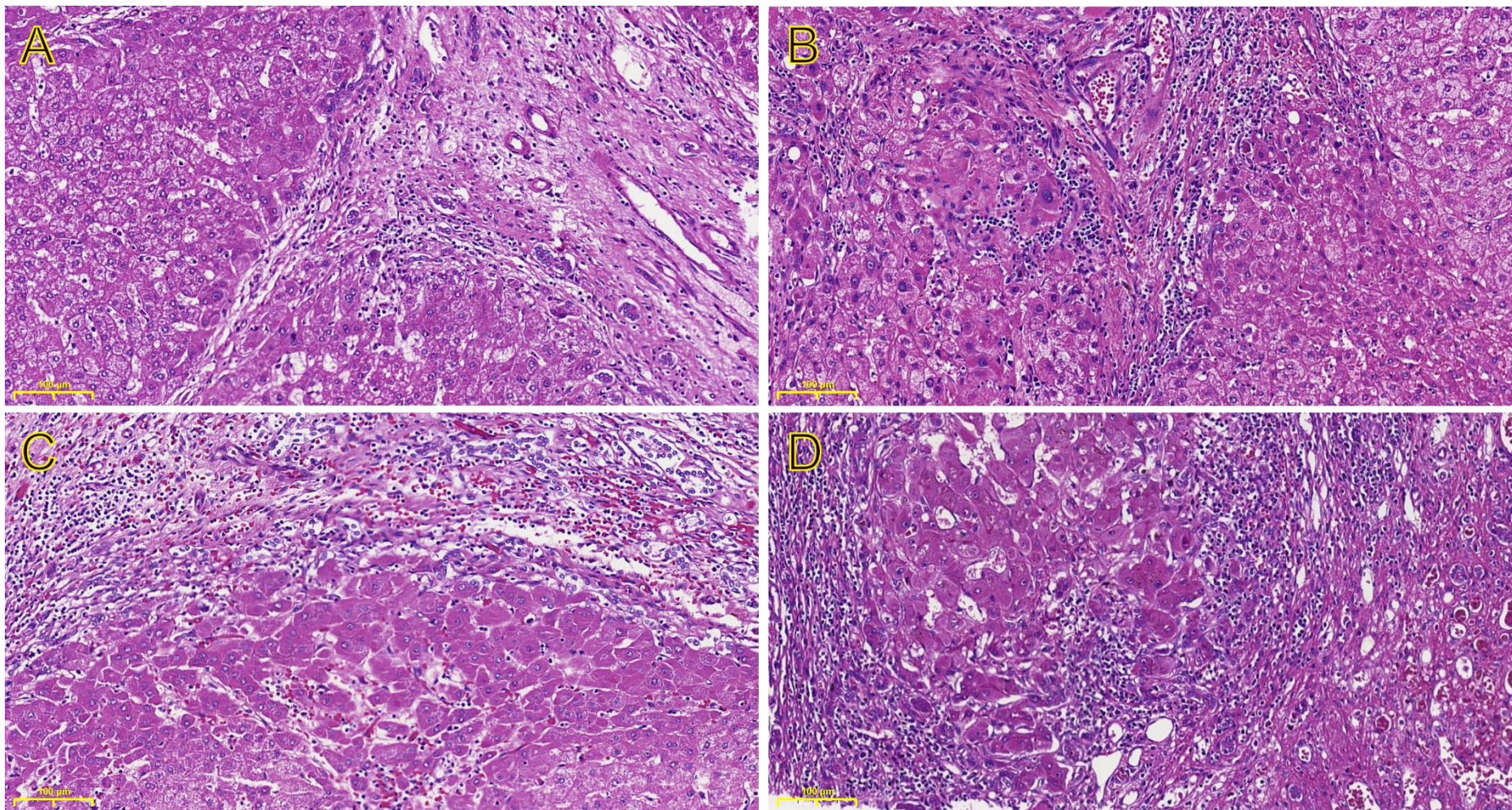


Figura 18. Exemplos dos achados da atividade de interface perisepal. (A) Grau 1, (B) Grau 2, (C) Grau 3, (D) Grau 4. HE, 20X. Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.2.1.3 Atividade necroinflamatória no compartimento lobular

As alterações necroinflamatórias do compartimento lobular foram estudadas sob a forma de necrose lítica focal ou apoptose e necrose confluyente.

#### 5.2.1.3.1 Necrose lítica focal

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, um paciente tratado (2,4%) não apresentou necrose lítica focal, 13 (31%) apresentaram um foco ou menos de necrose lítica focal (grau 1), sete (16,7%) com dois a quatro focos de necrose lítica focal (grau 2) e apenas um (2,4%) com cinco a dez focos de necrose lítica focal (grau 3).

No grupo de pacientes não tratados, oito (19%) apresentaram um foco ou menos de necrose lítica focal (grau 1), 11 pacientes (26,2%) com dois a quatro focos de necrose lítica focal (grau 2) e apenas um paciente (2,4%) com cinco a dez focos de necrose lítica focal (grau 3).

Tais achados demonstram que a necrose lítica focal esteve presente na maioria dos casos, mesmo nos tratados. Todavia, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,393$ ; **Tabela 1**). A não diferença estatística significativa se manteve mesmo após a categorização desta variável em baixa e alta atividade.

Exemplos de necrose lítica focal são apresentados na **Figura 19**.

#### 5.2.1.3.2 Necrose confluyente

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, 20 pacientes tratados (47,6%) não apresentaram necrose confluyente (grau 0) enquanto dois (31%) mostraram necrose confluyente grau 1.

No grupo de pacientes não tratados, 15 paciente (35,7%) não apresentaram necrose confluyente (grau 0), dois (4,8%) com grau 1 de necrose confluyente, dois (4,8%) com grau 2 de necrose confluyente e um (2,4%) apresentou necrose confluyente grau 3.

Tais achados demonstram que a necrose confluyente é um achado pouco frequente nos casos de hepatite C crônica e o encontro de formas mais acentuadas de necrose confluyente (graus 2 e 3) foi detectado somente entre pacientes não tratados. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,305$ ; **Tabela 1**). A não diferença estatística significativa se manteve mesmo após a categorização desta variável em baixa e alta atividade.

Exemplos de necrose confluyente são apresentados na **Figura 20**.

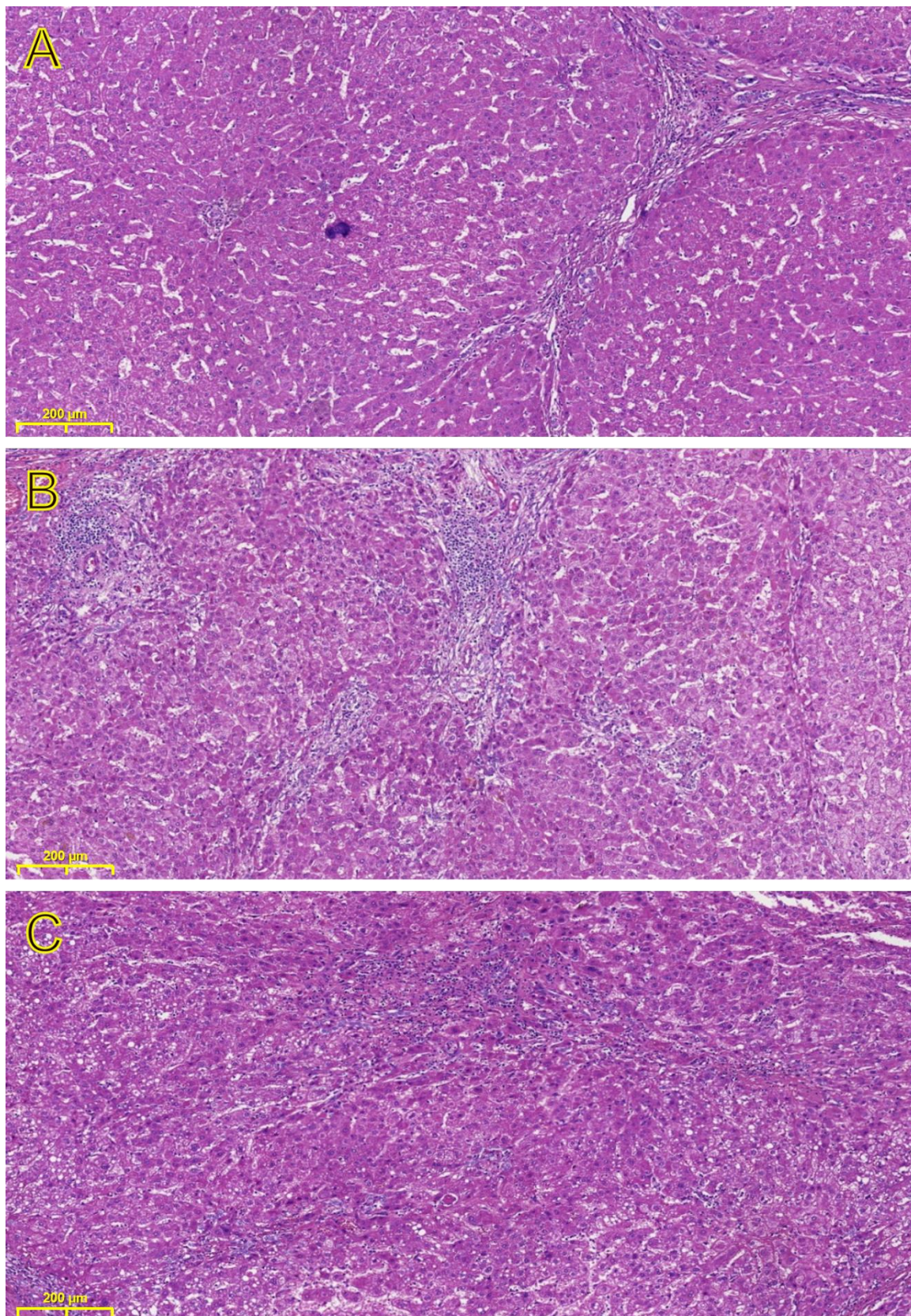


Figura 19. Achados referentes aos diferentes graus de necrose lítica focal. (A) Grau 1, (B) Grau 2, (C) Grau 3. HE, 10X. Fonte: Elaborada pela autora.

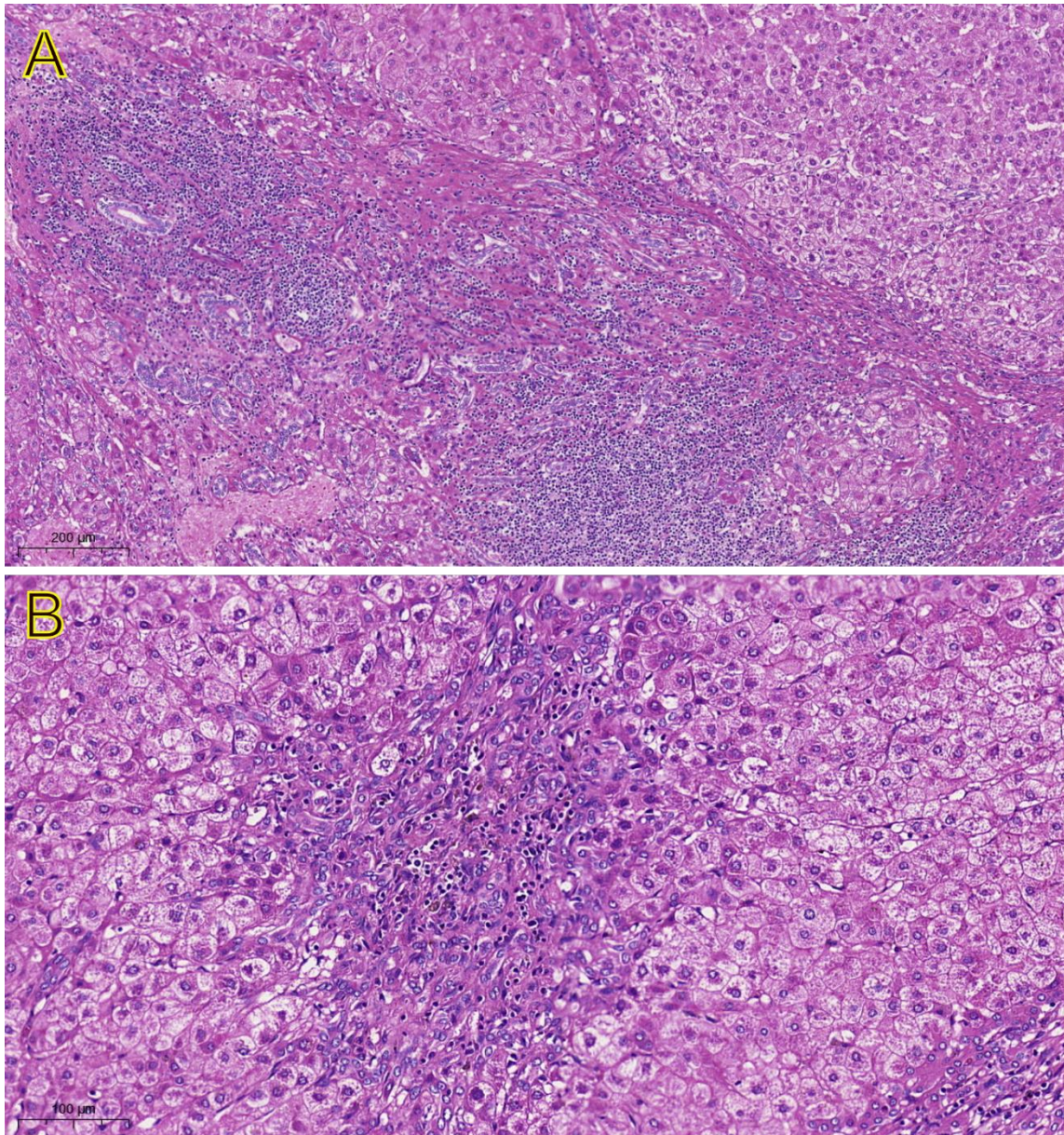


Figura 20. Exemplos de necrose confluyente. (A) Grau 1, HE, 10X; (B) Grau 2, HE, 20X. Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.2.2 Alteração arquitetural

### 5.2.2.1 Estádio da fibrose

Todos os 42 pacientes do estudo foram confirmados com cirrose amplamente desenvolvida, classificados como estágio 6 de fibrose da classificação de Ishak et al. [98].

### 5.2.2.2 Estadiamento da cirrose

Conforme apresentado na **Tabela 1**, sete pacientes tratados (16,7%) apresentaram cirrose leve (4A), dez (23,8%) com cirrose moderada (4B) e cinco (11,9%) com cirrose avançada (4C).

No grupo de pacientes não tratados, quatro (9,5%) apresentaram cirrose leve (4A), 13 (31%) com cirrose moderada (4B), e apenas três (7,1%) apresentaram cirrose avançada (4C).

Tais achados demonstram a maior concentração de pacientes com cirrose moderada (4B), independente do tratamento antiviral, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0.445$ ; **Tabela 1**).

Exemplos do estadiamento da cirrose são apresentados na **Figura 21**.

### 5.2.2.3 Regressão da fibrose

Conforme apresentado na **Tabela 1**, em três pacientes tratados, (7,1%) a regressão da fibrose foi ausente (grau 0). Sete (16,7%) apresentaram regressão da fibrose envolvendo menos de 33% dos septos fibrosos (grau 1), de 33% a 66% dos septos fibrosos (grau 2) em 11 pacientes (26,2%) e apenas um (2,4%) apresentou regressão da fibrose acima de 66% dos septos fibrosos (grau 3).

No grupo de pacientes não tratados, em quatro pacientes (9,5%) a regressão da fibrose foi ausente (grau 0). Sete (16,7%) apresentaram regressão da fibrose envolvendo menos de 33% dos septos fibrosos (grau 1), de 33% a 66% dos septos fibrosos (grau 2) em oito pacientes (19,0%) e apenas um (2,4%) apresentou regressão da fibrose envolvendo acima de 66% dos septos fibrosos (grau 3).

Tais achados demonstram graus similares de regressão da fibrose entre os dois grupos, não tendo sido observada diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,914$ ; **Tabela 1**), mesmo após a categorização desta variável.

Exemplos de regressão da fibrose são apresentados na **Figura 22**.



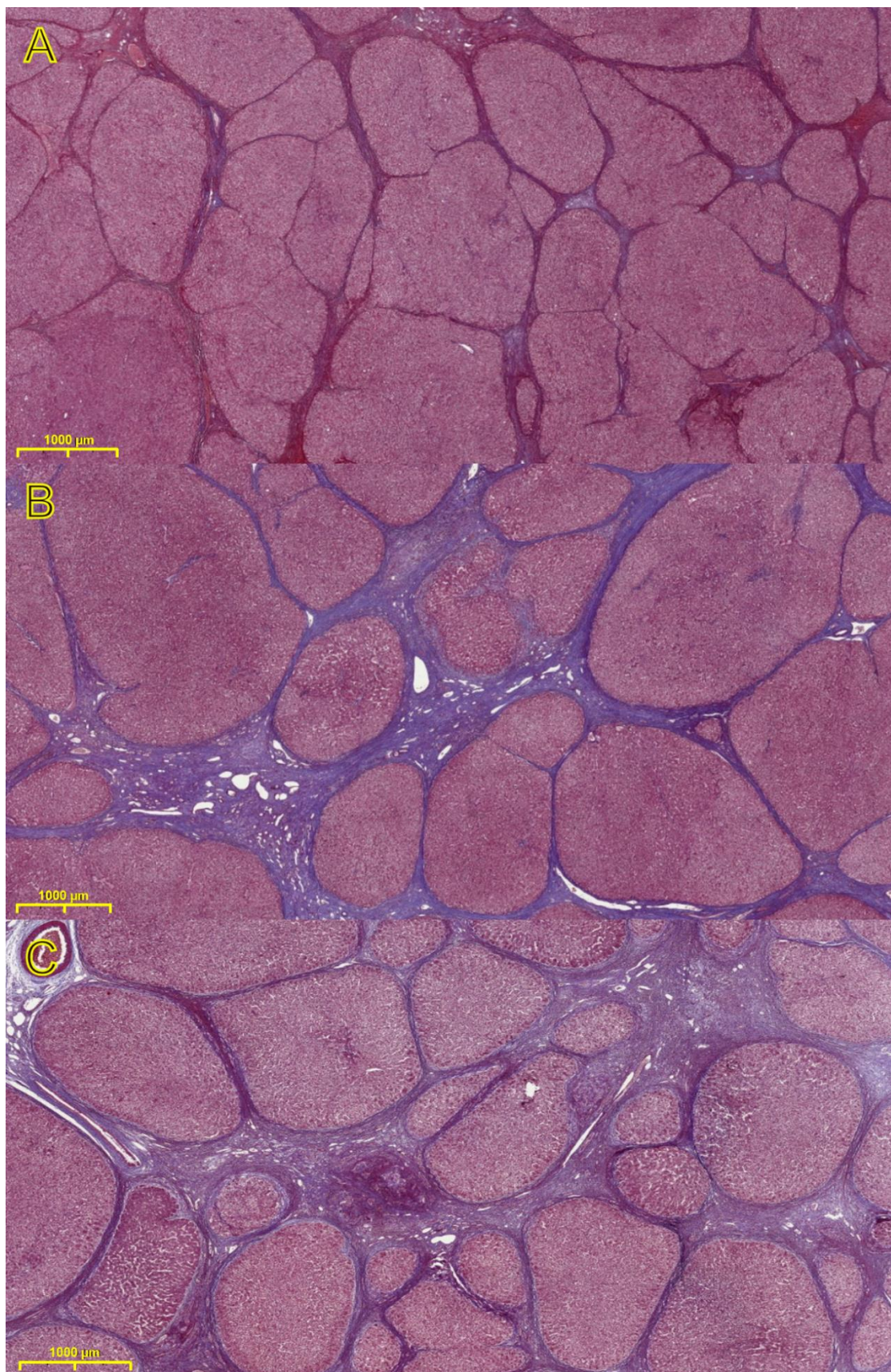


Figura 21. Exemplos dos diferentes estádios de cirrose: (A) cirrose leve, (B) cirrose moderada, (C) cirrose avançada. Masson, 10X. Fonte: Elaborada pela autora.

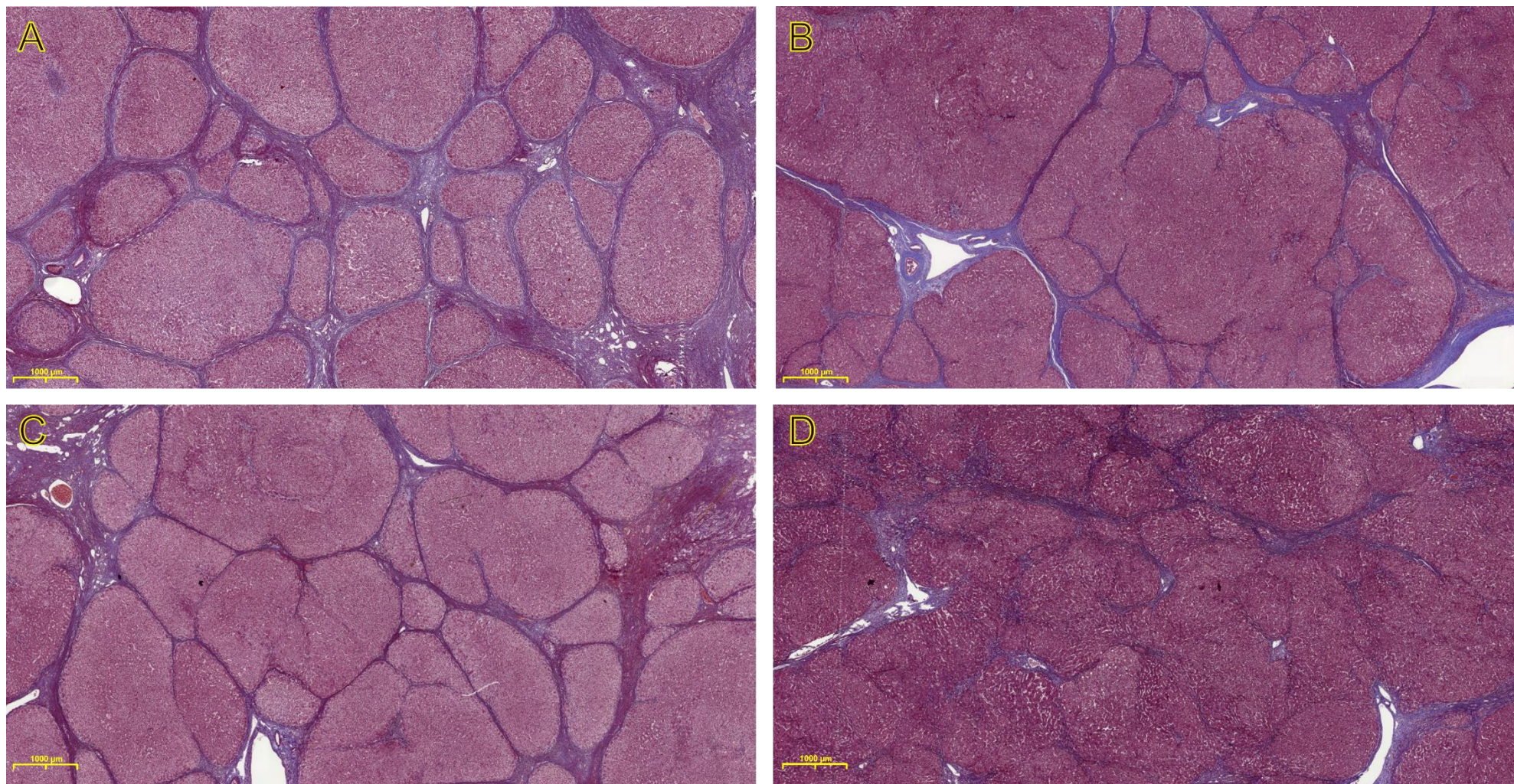


Figura 22. Aspectos das características de regressão da fibrose. (A) Grau 0, (B) Grau 1, (C) Grau 2, (D) grau 3. Masson, 10X. Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.2.3 Achados relacionados a doença gordurosa

#### 5.2.3.1 Esteatose

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, a esteatose foi ausente (grau 0) em 19 pacientes tratados (45,2%). dois (4,8%) apresentaram esteatose < 33% (grau 1), apenas um com esteatose entre 33% e 66% (grau 2) e nenhum paciente apresentou esteatose > 66% (grau 3). No grupo de pacientes não tratados, a esteatose foi ausente (grau 0) em 15 indivíduos (35,7%). Quatro (7,1%) apresentaram esteatose < 33% (grau 1), um (2,4%) entre 33% e 66% (grau 2) e não houve pacientes classificados como esteatose > 66% (grau 3). No estudo havia oito pacientes com esteatose e, entre eles, cinco com genótipo 1 e três pacientes com genótipo 3.

Tais achados demonstram que a esteatose, embora descrita na hepatite C crônica, não é um achado predominante entre os pacientes. Não ocorreu diferença estatística significativa com relação a presença de esteatose entre os grupos de pacientes, mesmo quando essa variável foi categorizada apenas em baixo e alto grau ( $p = 0,593$ ; **Tabela 1**).

Exemplos de esteatose são apresentados na **Figura 23**.

#### 5.2.3.2 Balonização hepatocelular

Conforme pode ser observado na Tabela 1, a balonização hepatocelular foi ausente ou mínima (grau 0) em 19 pacientes tratados (45,2%). Dois (4,8%) apresentaram balonização hepatocelular moderada (grau 1) e apenas um paciente (2,4%) apresentou balonização hepatocelular acentuada (grau 2).

No grupo de pacientes não tratados, a balonização foi ausente ou mínima (grau 0) em 15 indivíduos (35,7%). Três (7,1%) apresentaram balonização moderada (grau 1) e dois (2,4%), balonização acentuada (grau 2).

Tais achados demonstram que a balonização hepatocelular é infrequente entre os pacientes com hepatite C crônica. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,634$ ; Tabela 1).

Exemplos de balonização hepatocelular são apresentados na **Figura 24**.

### 5.2.3.3 *Esteato-hepatite*

Conforme apresentado na **Tabela 1**, apenas um paciente tratado (2,4%) foi diagnosticado com esteato-hepatite (sexo feminino, 58 anos, genótipo 1), e 21 (50%) não apresentaram este diagnóstico.

No grupo de pacientes não tratados, dois indivíduos (4,8%) foram diagnosticados com esteato-hepatite (ambos do sexo masculino, 56 e 65 anos, genótipos 1 e 3), e 18 (42,9%) não apresentaram este diagnóstico.

Tais achados não permitiram caracterizar eventual associação entre hepatite C crônica e o diagnóstico de esteato-hepatite ( $p = 0,598$ ; **Tabela 1**).

Exemplos de esteato-hepatite são apresentados na **Figura 25**.

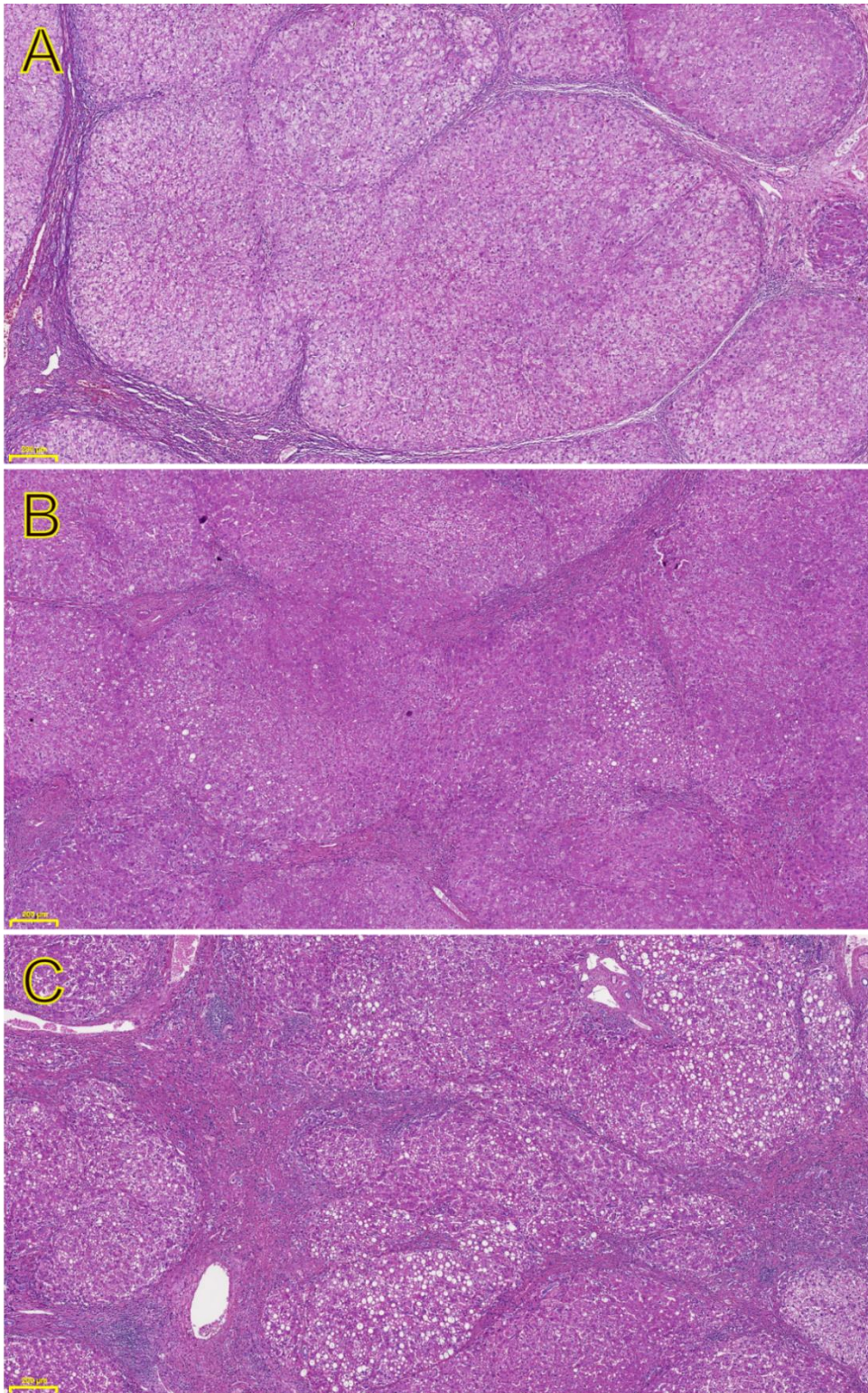


Figura 23. Exemplos de achados de esteatose. (A) Grau 0, (B) Grau 1, (C) Grau 2. HE, 5X. Fonte: Elaborada pela autora.

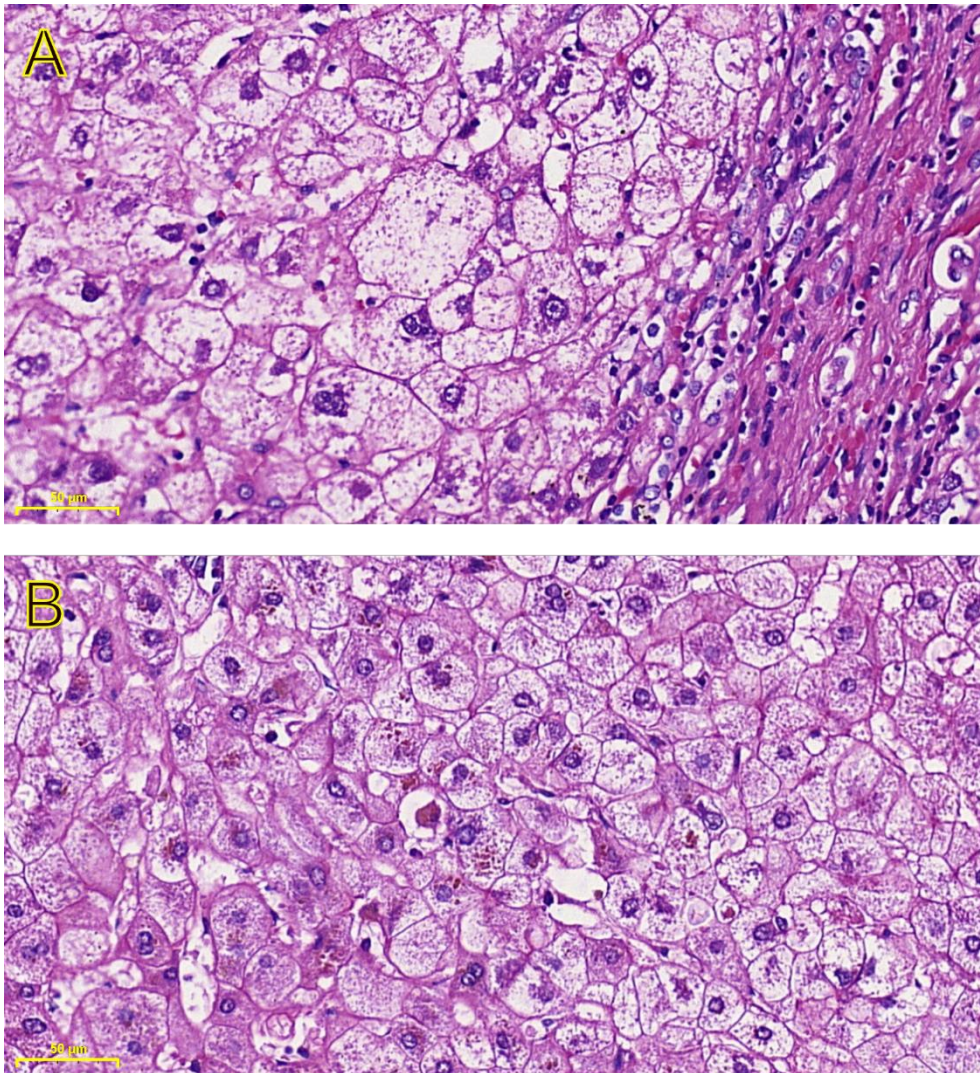


Figura 24. Balonização hepatocelular. (A) Grau 2, (B) Grau 1. HE, 40X. Fonte: Elaborada pela autora.

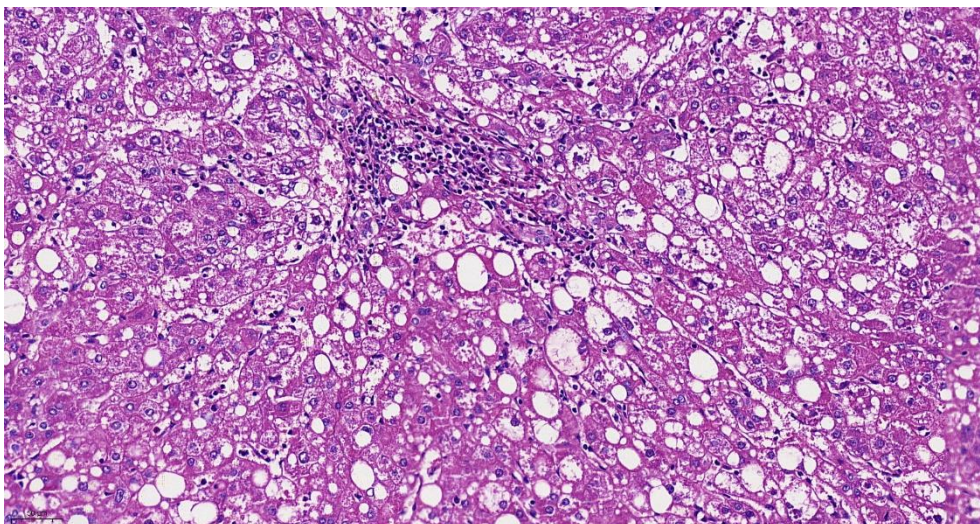


Figura 25. Alterações histológicas caracterizando esteato-hepatite. HE, 20X. Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.3 Considerações quanto ao tempo de tratamento

Diante dos dados expostos no **Anexo A**, a partir dos prontuários e laudos anatomopatológicos foram obtidas a data do transplante e início do tratamento dos pacientes pertencentes ao grupo tratado, com carga viral indetectável.

O tempo do início do tratamento até o transplante apresentou a seguinte distribuição: três casos com intervalo de até seis meses; quatro com intervalo entre sete e 12 meses; e 15 acima de 12 meses.

Ao analisar o intervalo entre o tratamento e o transplante com as variáveis histológicas (**Anexo C**), observamos que os pacientes com maiores intervalos entre o tratamento e o transplante apresentaram graus menores de inflamação septal e atividade de interface.

Os quatro pacientes tratados com inflamação septal moderada ou marcada (grau 3) tiveram intervalo entre o tratamento e o transplante inferior a 12 meses. Os oito pacientes tratados com inflamação septal leve (grau 1) tiveram o intervalo entre o tratamento e o transplante superior a seis meses, e em sete, o tempo foi superior a 12 meses.

Cinco pacientes foram tratados com atividade de interface perisseptal moderada e contínua (grau 3) e quatro deles apresentaram o intervalo até o transplante inferior a 12 meses. Os dez pacientes tratados com hepatite de interface perisseptal discreta (grau 1), tiveram o intervalo entre o tratamento e o transplante superior a seis meses e em sete, o intervalo foi superior a 12 meses.

Assim como a distribuição do estadiamento da cirrose e a regressão da fibrose, as variáveis necrose lítica focal e necrose confluyente não demonstraram diferença com relação ao tempo entre o tratamento e transplante.

Ao analisar o intervalo entre o tratamento e o transplante com a ativação da CPH (**Anexo C**), também não observamos diferença em relação ao tempo entre o tratamento e o transplante. Entre os sete pacientes com intervalo entre o tratamento e o transplante inferior a 12 meses, apenas um deles apresentou alto escore final para CPH.

#### 5.4 Correlação entre variáveis histológicas

A **Tabela 2** apresenta a correlação entre as variáveis histológicas, estudada pelo teste de correlação de Spearman. Através desses dados, observamos que houve uma correlação forte ( $|0,600| > \rho > |0,799|$ ) entre as variáveis inflamação septal e atividade de interface ( $\rho = 0,715$ ,  $P < 0,01$ ), e entre as variáveis balonização e esteato-hepatite ( $\rho = 0,625$ ,  $P < 0,01$ ). Também observamos uma forte correlação inversa entre a variável regressão de fibrose e o estadiamento de cirrose ( $\rho = -0,609$ ,  $P < 0,01$ ).

Também foi possível notar correlações moderadas ( $|0,300| > \rho > |0,599|$ ) entre as variáveis: atividade de interface e necrose lítica focal ( $\rho = 0,314$ ,  $P < 0,01$ ); necrose lítica focal e necrose confluyente ( $\rho = 0,343$ ,  $P < 0,01$ ), esteatose ( $\rho = 0,342$ ,  $P < 0,05$ ), balonização hepatocelular ( $\rho = 0,351$ ,  $P < 0,05$ ) e esteato-hepatite ( $\rho = 0,342$ ,  $P < 0,05$ ); e esteatose e esteato-hepatite ( $\rho = 0,572$ ,  $P < 0,01$ ). Percebemos também uma correlação inversa moderada entre as variáveis: inflamação septal e regressão de fibrose ( $\rho = -0,317$ ,  $P < 0,05$ ); o estadiamento de cirrose e a esteatose ( $\rho = -0,319$ ,  $P < 0,05$ ), e a esteato-hepatite ( $\rho = -0,394$ ,  $P < 0,01$ ).

**Tabela 2.** Correlação entre variáveis histológicas

	Inflamação septal	Atividade de interface	Necrose lítica focal	Necrose confluyente	Estadiamento de cirrose	Regressão de fibrose	Esteatose	Balonização hepatocelular	Esteato-hepatite
Inflamação septal	1,00								
Atividade de interface	0,715**	1,00							
Necrose lítica focal	0,279	0,314*	1,00						
Necrose confluyente	0,142	0,298	0,343*	1,00					
Estadiamento de cirrose	0,225	0,189	-0,105	-0,020	1,00				
Regressão de fibrose	-0,317*	-0,268	0,018	0,006	-0,609**	1,00			
Esteatose	0,142	0,050	0,342*	-0,066	-0,319*	0,086	1,00		
Balonização hepatocelular		0,025	0,351*	0,230	-0,177	0,027	0,282	1,00	
Esteato-hepatite	0,057	-0,073	0,342*	0,106	-0,394**	0,234	0,572**	0,625**	1,00

**Nota:** A intensidade da coloração amarela indica a força da correlação, quanto mais intensa, maior a correlação entre as variáveis. A ausência de coloração indica que não há correlação. Correlação perfeita ( $\rho = |1|$ ), correlação muito forte ( $|0,8| < \rho < |0,99|$ ), correlação forte ( $|0,6| < \rho < |0,79|$ ), correlação moderada ( $|0,3| < \rho < |0,59|$ ), correlação fraca ( $|0,0| < \rho < |0,29|$ ). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .



## 5.5 Imuno-histoquímica

### 5.5.1 *Padrões de reatividade para CK7 como indicadores de ativação da célula progenitora hepática (CPH)*

A reação imuno-histoquímica para detecção de CK7 identificou as diferentes apresentações da célula progenitora hepática (CPH), sob a forma de células progenitoras isoladas (CPI), estruturas ductulares isoladas (EDI) e reação ductular (RD). As CPI e EDI foram analisadas separadamente, conforme sua presença em zona 1 (em torno da placa limitante) e em zonas 2 e 3 combinadas (região centrolobular). Os graus obtidos nas diferentes regiões analisadas (zona 1 e zonas 2 e 3 combinadas) foram somados, obtendo-se escores unificados para CPI e EDI. Ambos escores foram somados, resultando no escore final para ativação das células progenitoras hepáticas (CPH). A reação ductular (RD) foi analisada separadamente, na margem dos septos fibrosos. Os dados da semiquantificação para cada um dos 42 pacientes estão apresentados no **Anexo D**.

#### 5.5.1.1 *Análise das respostas iniciais da CPH sob a forma de células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI)*

##### a) *Análise semiquantitativa da reatividade para CK7 em CPI e EDI*

###### *Na Zona 1*

Conforme pode ser observado na **Tabela 3**, a avaliação da CPI na zona 1 demonstrou os 22 pacientes tratados (52,4%) com até 10 CPIs em mais de 1 septo (grau 1). No grupo de pacientes não tratados, 18 pacientes (42,9%) apresentaram até dez CPIs em mais de um septo (grau 1), enquanto dois (4,8%) apresentaram acima de dez CPIs em mais de um septo (grau 2). Tais achados não demonstram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de pacientes avaliados ( $p = 0,221$ ; **Tabela 3**). Exemplos da reação para CK7 em CPIs na zona 1 são apresentados **Figura 26**.

De acordo com a **Tabela 3**, a avaliação de EDIs na zona 1 demonstrou 14 pacientes tratados (33,3%) com até dez EDIs positivas para CK7 em um septo ou mais (grau 1) e oito pacientes (19%) com acima de dez EDIs positivas para CK7 em um septo ou mais (grau 2). No grupo de pacientes não tratados, foram três (7,1%) com até dez EDIs positivas para CK7 em um septo ou mais (grau 1) e 16 pacientes (38,1%) acima de dez EDIs positivas para CK7 em um septo ou mais (grau 2). Tais achados demonstram maior frequência de EDIs na zona 1 nos pacientes não tratados, com infecção ativa, ocorrendo

diminuição de EDIs com o tratamento. O encontro de EDIs na zona 1 foi significativamente maior no grupo de indivíduos não tratados ( $p = 0,002$ ; **Tabela 3**). Exemplos da reação para CK7 em EDIs na zona 1 são apresentados na **Figura 27**.

**Tabela 3.** Avaliação da reação para CK7 em padrão de células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI) em zona 1 (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Zona 1	Reação para CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<i>Células progenitoras isoladas</i>					0,221
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	22	52,4	18	42,9	
Grau 2	0	0,0	2	4,8	
<i>Estruturas ductulares isoladas</i>					<b>0,002</b>
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	14	33,3	3	7,1	
Grau 2	8	19,0	16	38,1	

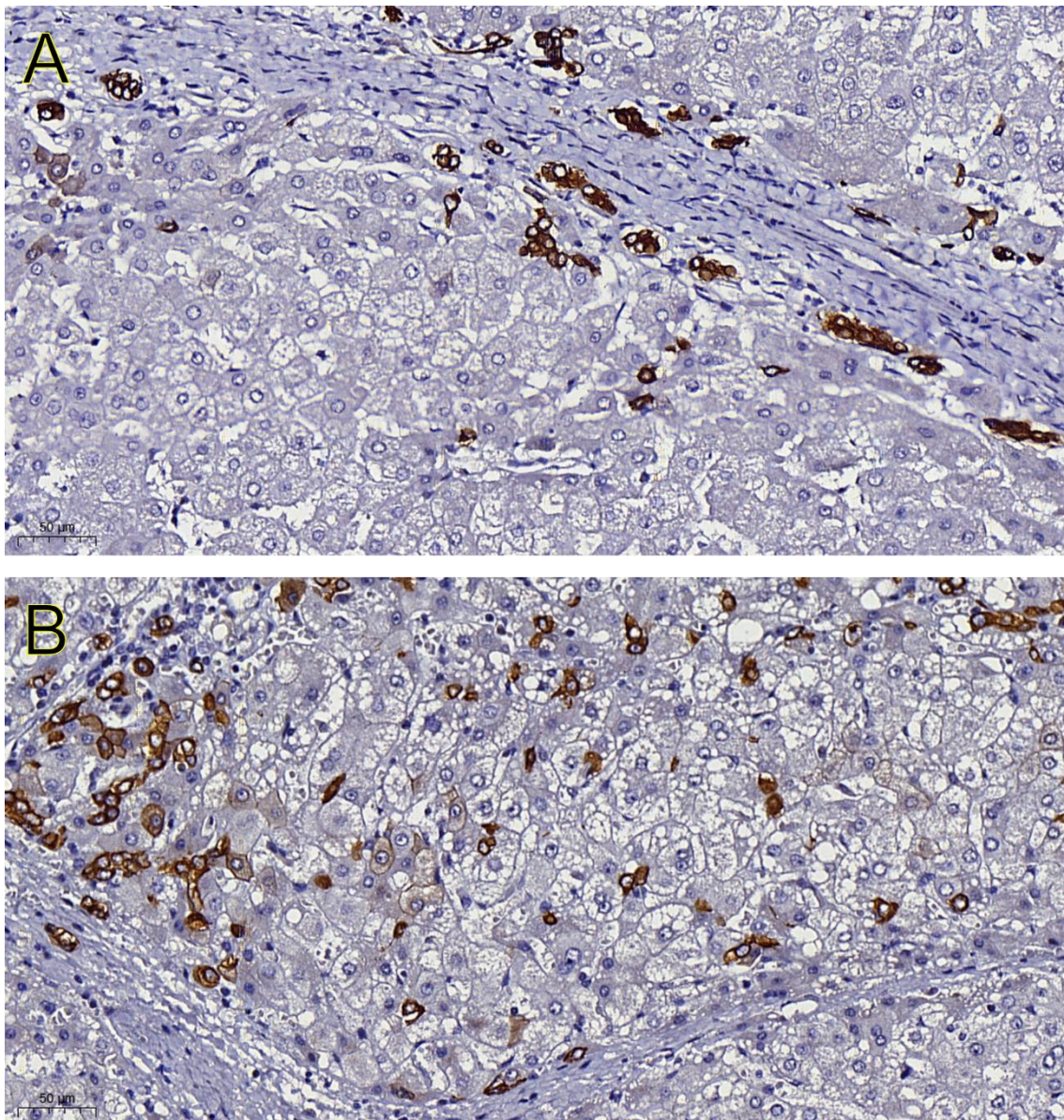


Figura 26. Representação dos diferentes graus avaliados para células progenitoras isoladas com reatividade CK7 em zona 1 do tecido hepático. (A) Grau 1, (B) grau 2. Objetiva: 20x. Fonte: Elaborada pela autora.

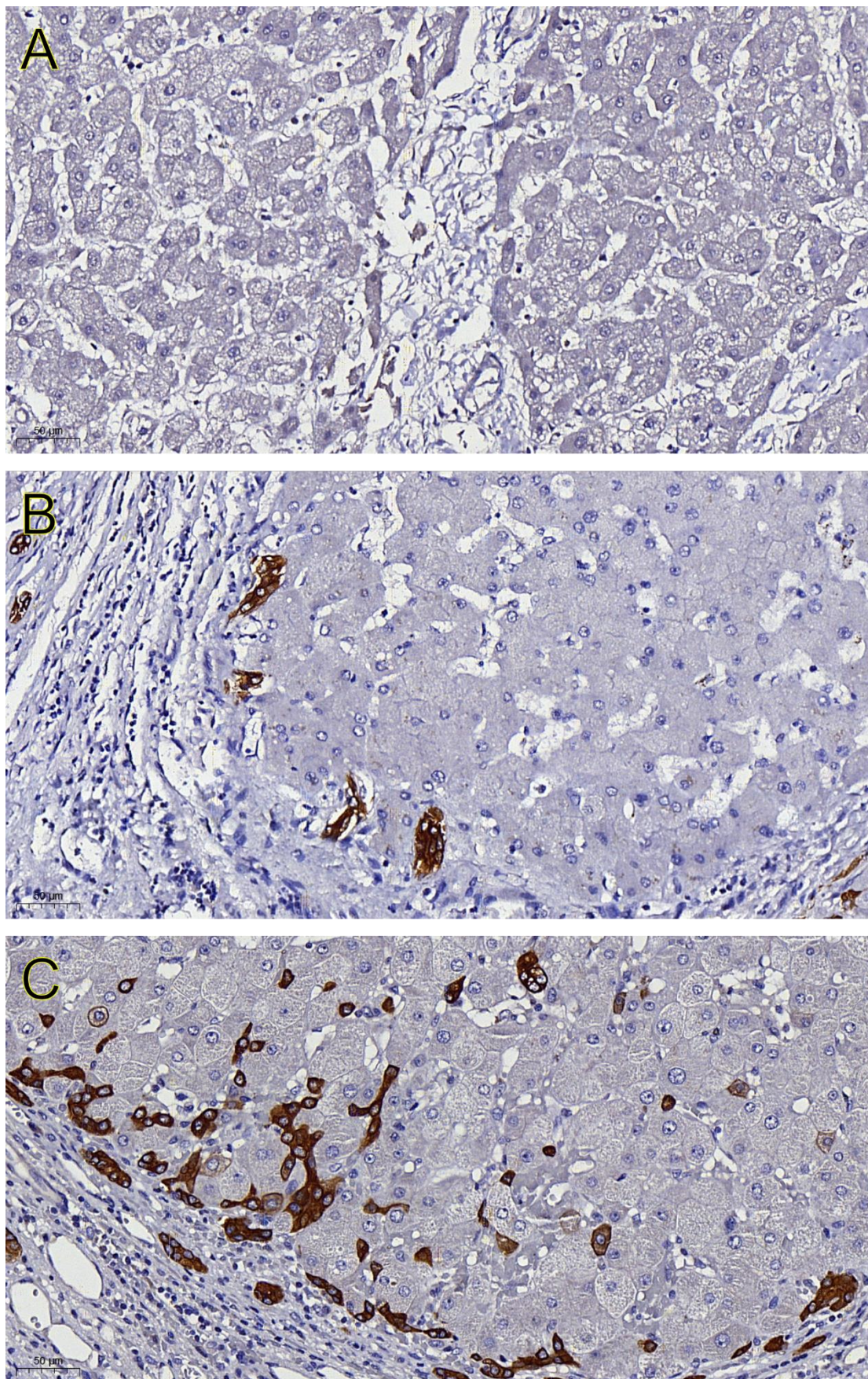


Figura 27. Diferentes graus de ativação de estruturas ductulares isoladas com imunopressão de CK7 em zona 1 do tecido hepático. (A) Grau 0, (B) grau 1, (C) grau 2. Objetiva: 20x. Fonte: Elaborada pela autora.

### Zonas 2 e 3 combinadas

Conforme apresentado na **Tabela 4**, a avaliação da CPI nas zonas 2 e 3 demonstrou ausência de CPI (grau 0) em dois pacientes tratados (4,8%). 19 (45,2%) apresentaram até 10% de CPIs positivas para CK7 em pelo menos um ácino (grau 1) e apenas um (2,4%) apresentou acima de 10% de CPIs em pelo menos um ácino (grau 2). No grupo de pacientes não tratados, 13 (31,0%) apresentaram até 10% de CPIs positivas para CK7 em pelo menos um ácino (grau 1) e sete (16,7%), acima de 10% de CPIs em pelo menos um ácino (grau 2). Tais achados demonstram graus significativamente maiores de CPI nas zonas 2 e 3 combinadas nos pacientes não tratados, com infecção ativa, ocorrendo diminuição de CPIs com o tratamento ( $p = 0,023$ ; **Tabela 4**). Exemplos da reação para CK7 em CPIs nas zonas 2 e 3 são apresentados **Figura 28**.

De acordo com a **Tabela 4**, a avaliação de EDIs nas zonas 2 e 3 demonstrou em dois pacientes tratados (4,8%) EDIs ausente (grau 0), 18 (42,9%) com até dez EDIs positivas para CK7 em um septo ou mais (grau 1) e dois (4,8%) apresentaram acima de 10% de EDIs positivos para CK7 em pelo menos um ácino (grau 2). No grupo de pacientes não tratados, nove (21,4%) apresentaram até 10% de EDIs positivas para CK7 em pelo menos um ácino (grau 1) e 11 (26,2%), acima de 10% de EDIs em pelo menos um ácino (grau 2). O encontro de EDIs em zonas 2 e 3 foi significativamente maior no grupo de indivíduos não tratados ( $p = 0,004$ ; **Tabela 4**). Tais achados demonstram maior frequência de EDIs nas zonas 2 e 3 combinadas nos pacientes com infecção ativa, ocorrendo diminuição de EDIs com o tratamento. Exemplos da reação para CK7 em EDIs nas zonas 2 e 3 são apresentados na **Figura 29**.

**Tabela 4.** Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando células progenitoras isoladas (CPI) e estruturas ductulares isoladas (EDI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Zonas 2 e 3	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<b><i>Células progenitoras isoladas</i></b>					<b>0,023</b>
Grau 0	2	4,8	0	0,0	
Grau 1	19	45,2	13	31,0	
Grau 2	1	2,4	7	16,7	
<b><i>Estruturas ductulares isoladas</i></b>					<b>0,004</b>
Grau 0	2	4,8	0	0,0	
Grau 1	18	42,9	9	21,4	
Grau 2	2	4,8	11	26,2	

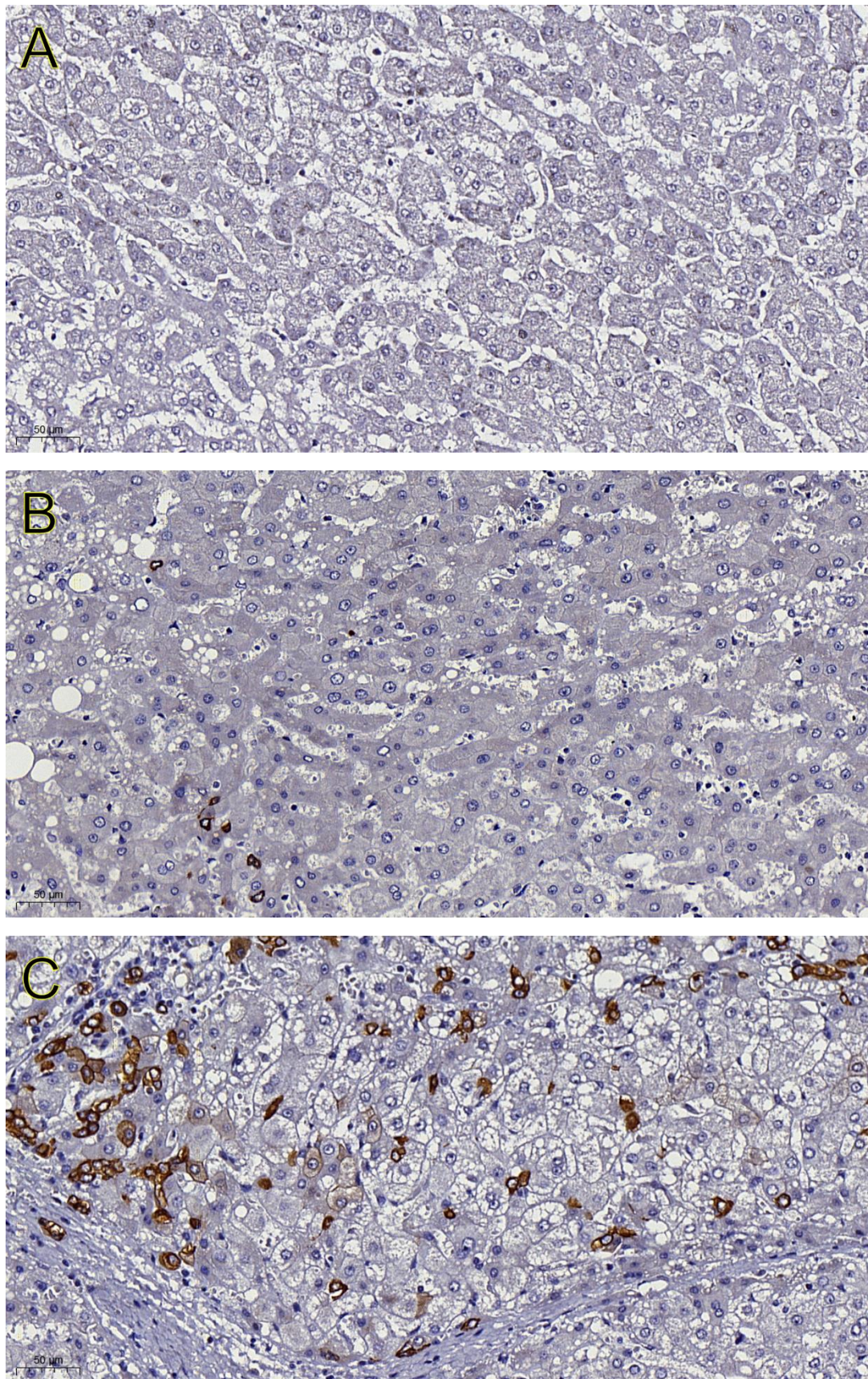


Figura 28. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para células progenitoras isoladas com imunoexpressão de CK7 em zonas 2 e 3 combinadas do tecido hepático. (A) Grau 0, (B) grau 1, (C) grau 2. Objetiva: 20x. Fonte: Elaborada pela autora.

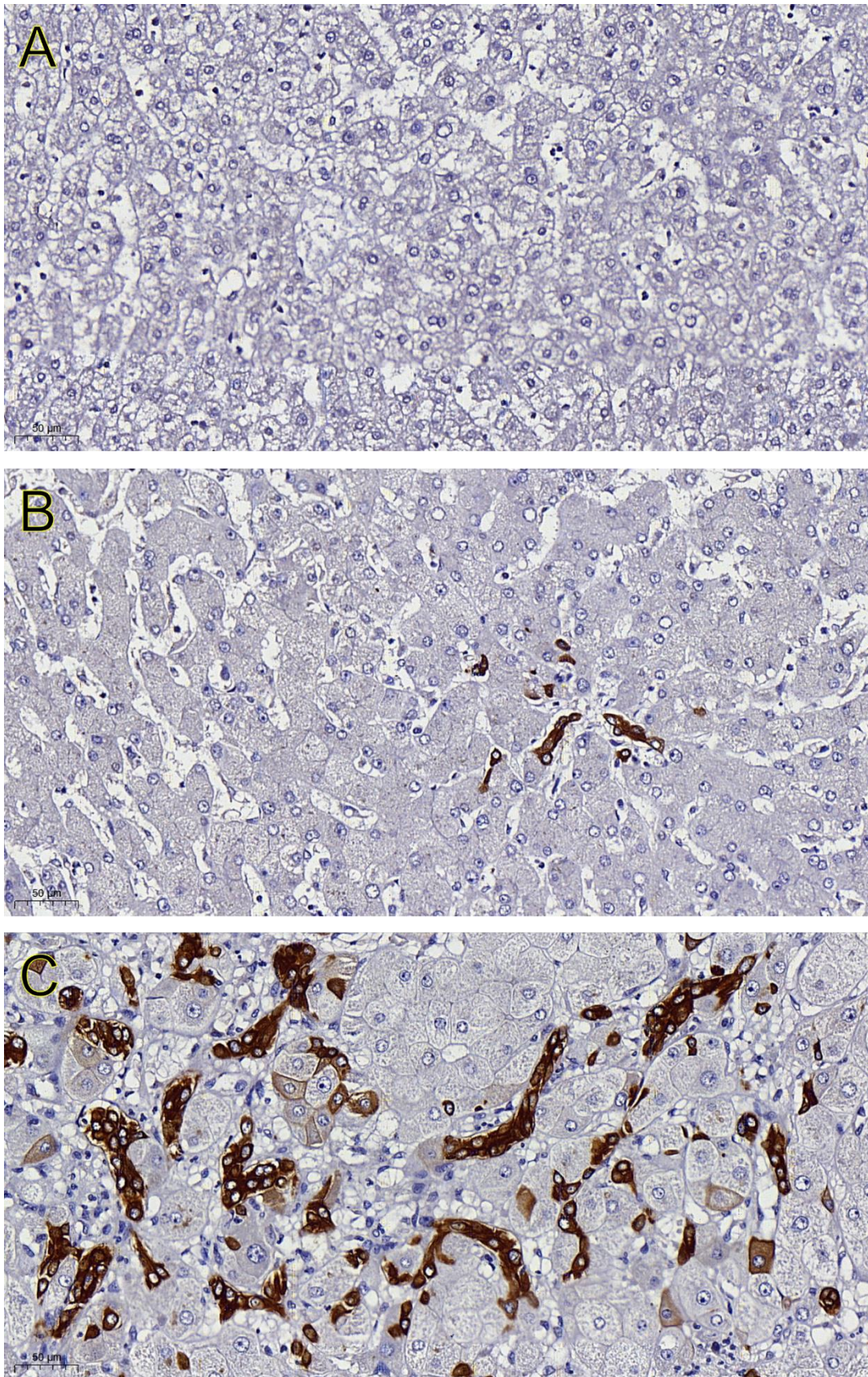


Figura 29. Diferentes graus de ativação de estruturas ductulares isoladas com imunexpressão de CK7 em zonas 2 e 3 combinadas do tecido hepático. (A) Grau 0, (B) grau 1, (C) grau 2. Objetiva: 20x. Fonte: Elaborada pela autora.

*b) Escore Unificado CPI e EDI*

A soma dos graus obtido pela análise de cada padrão de resposta de células progenitoras na zona 1 (0-2) ao grau obtido nas zonas 2 e 3 combinadas (0-2), resultou no escore unificado de cada padrão (CPI ou EDI). Assim, o escore unificado apresentou variação de 0 a 4, sendo categorizado posteriormente em baixo (0-2) e alto (3 e 4).

Para CPI, o escore unificado demonstrou 13 pacientes tratados (31%) com grau 1, oito (19%) com grau 2 e apenas um (2,4%) apresentando grau 3. No grupo de pacientes não tratados, o escore unificado para CPI demonstrou três (7,1%) com grau 1, nove (21,4%) com grau 2, sete (16,7%) com grau 3 e um (2,4%) com grau 4. Os achados apresentaram significância estatística ( $p=0,008$ ; **Tabela 5**), demonstrando maior número de pacientes não tratados com os maiores escores unificados para CPI. Após a categorização, observamos 21 pacientes tratados (50%) com baixo escore unificado e apenas um paciente tratado (2,4%) com alto escore unificado. No grupo de pacientes não tratados, observamos 12 pacientes (28,6%) com baixo escore unificado e oito (19%) com alto escore unificado. O encontro do baixo escore unificado para CPI foi significativamente maior no grupo de indivíduos tratados ( $p = 0,008$ ; **Tabela 6**).

**Tabela 5.** Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando células progenitoras isoladas (CPI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Células progenitoras isoladas	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<b><i>Escore unificado</i></b>					<b>0,008</b>
0	0	0,0	0	0,0	
1	13	31,0	3	7,1	
2	8	19,0	9	21,4	
3	1	2,4	7	16,7	
4	0	0,0	1	2,4	

**Tabela 6.** Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando células progenitoras isoladas (CPI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Células progenitoras isoladas	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<b><i>Escore unificado categorizado</i></b>					<b>0,008</b>
<i>Baixo</i>	21	50,0	12	28,6	
<i>Alto</i>	1	2,4	8	19,0	



Para EDI, o escore unificado demonstrou um paciente tratado (2,4%) com grau 1, 14 (33,3%) com grau 2 e sete (16,7%) apresentando grau 3. Não houve pacientes neste grupo com grau 4. No grupo de pacientes não tratados, o escore unificado para EDI demonstrou três (7,1%) com grau 2, seis (14,3%) com grau 3 e 11 (26,2%) com grau 4. Não houve pacientes neste grupo classificados com grau 1. Os achados demonstraram significância estatística ( $p < 0,001$ ; **Tabela 7**), apresentando maior número de pacientes não tratados com os maiores escores unificados para EDI. Após a categorização, observamos 15 pacientes tratados (35,7%) com baixo escore unificado e apenas sete (16,7%) apresentando alto escore unificado. No grupo de pacientes não tratados, três (7,1%) apresentaram baixo escore unificado e 17 (40,5%), alto escore unificado. O encontro do baixo escore unificado para EDI foi significativamente maior no grupo de indivíduos tratados ( $p = 0,001$ ; **Tabela 8**).

**Tabela 7.** Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando estruturas ductulares isoladas (EDI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Estruturas ductulares isoladas	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<i>Escore unificado</i>					<b>&lt; 0,001</b>
0	0	0,0	0	0,0	
1	1	2,4	0	0,0	
2	14	33,3	3	7,1	
3	7	16,7	6	14,3	
4	0	0,0	11	26,2	

**Tabela 8.** Avaliação da reatividade para CK7 caracterizando estruturas ductulares isoladas (EDI) (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Estruturas ductulares isoladas	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<i>Escore unificado categorizado</i>					<b>0,001</b>
<i>Baixo</i>	15	35,7	3	7,1	
<i>Alto</i>	7	16,7	17	40,5	

c) *Escore Final para célula progenitora hepática (CPH)*

A soma dos graus obtidos no escore unificado para CPI (0-4) com o escore unificado para EDI (0-4), resultou no escore final representativo da CPH. Este escore final apresentou variação de 0 a 8, sendo categorizado posteriormente em baixo (0-4) e alto (5 a 8).

O escore final demonstrou um paciente tratado (2,4%) com grau 2, dez (23,8%) com grau 3, seis (14,3%) com grau 4, quatro com grau 5 (9,5%) e apenas um (2,4%) apresentou grau 6. Não houve paciente tratado com graus 7 e 8 de escore total para CPH. No grupo de pacientes não tratados, o escore total para CPH demonstrou quatro (9,5%) com grau 4, 6 pacientes (14,3%) com grau 5, três (7,1%) com grau 6, seis (14,3%) com grau 7 e um (2,4%) apresentou grau 8. Neste grupo, não houve pacientes classificados com graus 1, 2 e 3. Os achados demonstraram significância estatística ( $p=0,003$ ; **Tabela 9**), apresentando maior número de pacientes não tratados apresentando os maiores escores final para CPH. Após a categorização, observamos 17 pacientes tratados (40,5%) com baixo escore final para CPH e apenas cinco (11,9%) apresentaram alto escore final para CPH. No grupo de pacientes não tratados, observamos quatro (9,5%) com baixo escore e 16 (38,1%) com alto escore final para CPH. O encontro do baixo escore final para CPH foi significativamente maior no grupo de indivíduos tratados. Tais achados demonstram maior frequência de CPH nos pacientes com infecção ativa, ocorrendo diminuição com o tratamento ( $p = 0,001$ ; **Tabela 10**).

**Tabela 9.** Avaliação da reatividade para CK7 – escore final (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Escore final	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
0	0	0,0	0	0,0	<b>0,003</b>
1	0	0,0	0	0,0	
2	1	2,4	0	0,0	
3	10	23,8	0	0,0	
4	6	14,3	4	9,5	
5	4	9,5	6	14,3	
6	1	2,4	3	7,1	
7	0	0,0	6	14,3	
8	0	0,0	1	2,4	

**Tabela 10.** Avaliação da reatividade para CK7 – escore total (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Escore Total	Imunoexpressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<i>Baixo</i>	17	40,5	4	9,5	<b>0,001</b>
<i>Alto</i>	5	11,9	16	38,1	

Quando o escore final para CPH foi relacionado com as características histológicas (**Tabela 11**), ocorreu uma relação com significância estatística para a variável inflamação septal ( $p=0,036$ ). Observamos seis (14,3%) com grau 1 de inflamação septal e 12 (28,6%) com grau 2, todos apresentando baixo escore final para CPH. Observamos 11 (26,2%) com grau 3 de inflamação septal e um único indivíduo com grau 4 de inflamação septal, todos apresentando alto escore para CPH. A maioria dos indivíduos com os menores graus de inflamação septal apresentou baixo escore final para CPH, e a maioria dos indivíduos com os maiores graus de inflamação septal apresentou alto escore final para CPH, ou seja, quanto maior a inflamação, mais alto é o grau de ativação da CPH. Notamos ainda uma tendência de associação entre o escore final para CPH e a atividade de interface, com maiores escores obtidos nos casos de maior atividade necroinflamatória, com  $p = 0,099$ .

**Tabela 11.** Relação do escore final para CPH com as características histológicas

Característica histológica	Escore final para CPH		P
	Baixo	Alto	
<b>Inflamação septal</b>			<b>0,036</b>
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	6 (14,3%)	3 (7,1%)	
Grau 2	12 (28,6%)	6 (14,3%)	
Grau 3	3 (7,1%)	11 (26,2%)	
Grau 4	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
<b>Atividade de interface</b>			0,099
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	8 (19,0%)	2 (4,8%)	
Grau 2	8 (19,0%)	8 (19,0%)	
Grau 3	5 (11,9%)	10 (23,8%)	
Grau 4	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
<b>Necrose lítica focal</b>			0,242
Grau 0	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
Grau 1	13 (31,0%)	8 (19,0%)	
Grau 2	6 (14,3%)	12 (28,6%)	
Grau 3	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
<b>Necrose confluyente</b>			0,354
Grau 0	19 (45,2%)	16 (38,1%)	
Grau 1	2 (4,8%)	2 (4,8%)	
Grau 2	0 (0,0%)	2 (4,8%)	
Grau 3	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
<b>Estadiamento de cirrose</b>			0,506
A	7 (16,7%)	4 (9,5%)	
B	11 (26,2%)	12 (28,6%)	
C	3 (7,1%)	5 (11,9%)	
<b>Regressão de fibrose</b>			0,457
Grau 0	3 (7,1%)	4 (9,5%)	
Grau 1	5 (11,9%)	9 (21,4%)	
Grau 2	12 (28,6%)	7 (16,7%)	
Grau 3	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
<b>Esteatose</b>			1,000
Grau 0	17 (40,5%)	17 (16,7%)	
Grau 1	3 (7,1%)	3 (7,1%)	
Grau 2	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Balonização hepatocelular</b>			0,272
0	19 (45,2%)	15 (35,7%)	
1	1 (2,4%)	4 (9,5%)	
2	1 (2,4%)	2 (4,8%)	
<b>Esteato-hepatite</b>			1,000
Ausente	20 (47,6%)	19 (45,2%)	
Presente	1 (2,4%)	2 (4,8%)	

### 5.5.1.2 Análise semiquantitativa da reatividade para CK7 na reação ductular

(RD) em torno à placa limitante

Conforme pode ser observado na **Tabela 12**, a avaliação da RD demonstrou 17 pacientes tratados (40,5%) com RD ausente (grau 0) e cinco (11,9%) com RD focal, descontínua (grau 1). No grupo de pacientes não tratados, houve seis (14,3%) com RD ausente, dez (23,8%) com RD focal, descontínua (grau 1), e quatro (9,5%) apresentando extensão intermediária da RD (grau 2). O encontro da RD foi significativamente maior no grupo de indivíduos não tratados ( $p = 0,004$ ; **Tabela 12**). Exemplos da reação para CK7 na RD são apresentados na **Figura 30**.

**Tabela 12.** Avaliação da reação de CK7 caracterizando reação ductular (RD), (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Reação ductular	Expressão de CK7				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
Grau 0	17	40,5	6	14,3	<b>0,004</b>
Grau 1	5	11,9	10	23,8	
Grau 2	0	0,0	4	9,5	

Quando avaliamos a relação entre os resultados da reação para CK7 para RD e as características histológicas (**Tabela 13**), observamos que ocorreu uma associação com significância estatística para as variáveis inflamação septal ( $p = 0,010$ ), atividade de interface perisseptal ( $p = 0,002$ ), necrose confluyente ( $p = 0,006$ ) e balonização hepatocelular ( $p = 0,008$ ). Para as outras variáveis histológicas, não foram observadas associações com significância estatística.

Nenhum paciente, independente do grau de inflamação septal, apresentou reação para CK7 na RD ausente (grau 0). A maioria dos pacientes (16,7%) apresentou grau 1 de inflamação septal. RD focal descontínua (grau 1) e a reação para CK7 na RD contínua em acima de 50% dos septos (grau 3) foi observada apenas nos pacientes com graus 2 e 3 de inflamação septal.

Independente do grau de atividade de interface perisseptal, não houve pacientes com reação ausente para CK7 na RD (grau 0). Todos os pacientes (23,8%) com atividade de interface perisseptal grau 1 apresentaram reação para CK7 na RD focal descontínua (grau 1), e a reação para CK7 para RD contínua em acima de 50% dos septos (grau 3) não ocorreu nos pacientes com grau 1 de atividade de interface perisseptal. Destacamos ainda que o único paciente classificado como atividade de interface grau 4 apresentou reação para CK7 em RD contínua em acima de 50% dos septos (grau 3).

Observamos que, dos 35 pacientes do estudo com grau 0 de necrose confluyente, 22 deles (52,4%) apresentaram reação para CK7 na RD focal, descontínua (grau 0). Os três pacientes classificados com os maiores graus de necrose confluyente (graus 2 e 3) apresentaram os maiores graus de reação para CK7 na RD (graus 2 e 3).

Para a variável balonização hepatocelular, observamos que entre os 34 pacientes do estudo (80,9%) com balonização hepatocelular ausente (grau 0), 23 deles (54,8%) apresentaram reação para CK7 na RD focal, descontínua (grau 1).

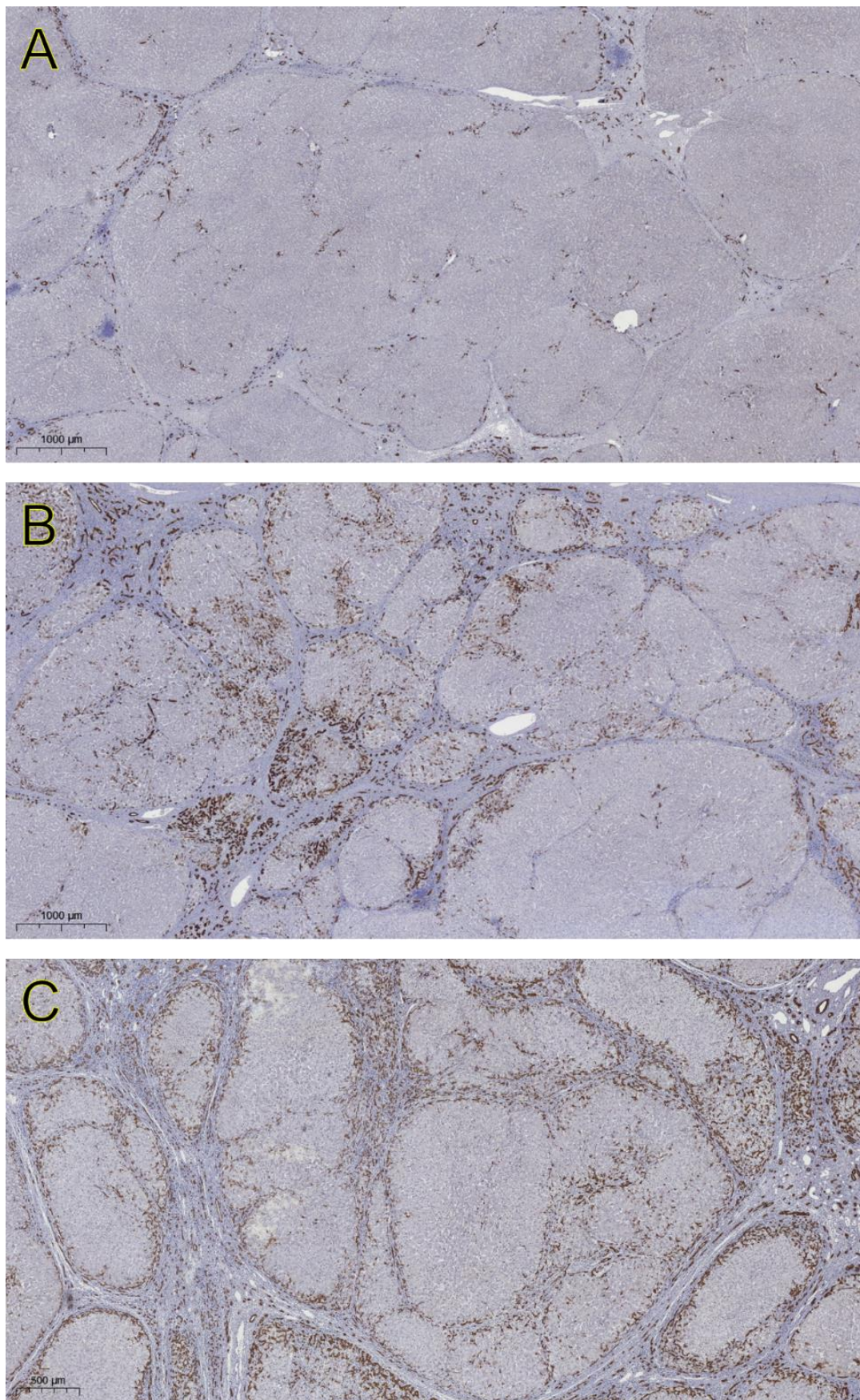


Figura 30. Representação dos diferentes graus avaliados para reação ductular (RD) marcada pela expressão de CK7 no tecido hepático. (A) Grau 1, (B) grau 2, (C) grau 3. Objetiva: 2x. Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 13.** Frequência da reação para CK7 para reação ductular distribuída entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica histológica	Reação para CK7 na RD				P
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	
<b>Inflamação portal e septal</b>					<b>0,010</b>
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	0 (0,0%)	7 (16,7%)	2 (4,8%)	0 (0,0%)	
Grau 2	0 (0,0%)	11 (26,2%)	7 (16,7%)	0 (0,0%)	
Grau 3	0 (0,0%)	5 (11,9%)	6 (14,3%)	3 (7,1%)	
Grau 4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
<b>Atividade de interface</b>					<b>0,002</b>
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	0 (0,0%)	10 (23,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 2	0 (0,0%)	6 (14,3%)	9 (21,4%)	1 (2,4%)	
Grau 3	0 (0,0%)	7 (16,7%)	6 (14,3%)	2 (4,8%)	
Grau 4	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
<b>Necrose lítica focal</b>					0,075
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
Grau 1	0 (0,0%)	16 (38,1%)	4 (9,5%)	1 (2,4%)	
Grau 2	0 (0,0%)	7 (16,7%)	8 (19,0%)	3 (7,1%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (4,8%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose confluyente</b>					<b>0,006</b>
Grau 0	0 (0,0%)	22 (52,4%)	11 (26,2%)	2 (4,8%)	
Grau 1	0 (0,0%)	1 (2,4%)	3 (7,1%)	0 (0,0%)	
Grau 2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
<b>Estadiamento de cirrose</b>					0,449
A	0 (0,0%)	7 (16,7%)	4 (9,5%)	0 (0,0%)	
B	0 (0,0%)	13 (31,0%)	8 (19,0%)	2 (4,8%)	
C	0 (0,0%)	3 (7,1%)	3 (7,1%)	2 (4,8%)	
<b>Regressão de fibrose</b>					0,701
Grau 0	0 (0,0%)	3 (7,1%)	3 (7,1%)	1 (2,4%)	
Grau 1	0 (0,0%)	6 (14,3%)	7 (16,7%)	1 (2,4%)	
Grau 2	0 (0,0%)	13 (31,0%)	4 (9,5%)	2 (4,8%)	
Grau 3	0 (0,0%)	1 (2,4%)	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Esteatose</b>					0,267
Grau 0	0 (0,0%)	20 (47,6%)	10 (23,8%)	4 (9,5%)	
Grau 1	0 (0,0%)	3 (7,1%)	3 (7,1%)	0 (0,0%)	
Grau 2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (4,8%)	0 (0,0%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Balonização hepatocelular</b>					<b>0,008</b>
0	0 (0,0%)	23 (54,8%)	8 (19,0%)	3 (7,1%)	
1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (9,5%)	1 (2,4%)	
2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (7,1%)	0 (0,0%)	
<b>Esteato-hepatite</b>					0,055
Ausente	0 (0,0%)	23 (54,8%)	12 (28,6%)	4 (9,5%)	
Presente	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (7,1%)	0 (0,0%)	

### 5.5.2 Achados imuno-histoquímicos da resposta linfocitária

O **Anexo E** apresenta os valores obtidos durante a quantificação realizada para os marcadores imuno-histoquímicos avaliados em cada um dos 42 casos.

#### 5.5.2.1 Linfócitos CD20+ na interface septal

A **Figura 31** exemplifica a identificação de linfócitos CD20+ na região da interface perisseptal do tecido hepático. A variação da expressão desse marcador foi de 10,54 a 151,49 células positivas/mm<sup>2</sup>, e a mediana foi de 42,51 células positivas/mm<sup>2</sup>.

No grupo de pacientes tratados, a variação da expressão de linfócitos CD20+ foi de 10,54 a 73,42 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 34,45 células positivas/mm<sup>2</sup>. No grupo de pacientes não tratados, a variação foi de 18,6 a 151,49 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 63,55 células positivas/mm<sup>2</sup>.

Conforme exposto na **Tabela 14**, 15 pacientes tratados (35,7%) apresentaram predomínio da baixa expressão de CD20+ e seis (14,3%) apresentaram alta expressão.

No grupo de pacientes não tratados, sete (16,7%) apresentaram baixa expressão CD20+ e 14 (33,3%) apresentaram alta expressão.

Tais achados demonstram o predomínio da baixa expressão de CD20+ nos pacientes tratados, enquanto nos não tratados, os casos com alta expressão de CD20+ predominaram, diferença que se mostrou estatisticamente significativa ao teste estatístico qui-quadrado de Pearson ( $p = 0,029$ , **Tabela 14**). Não observamos associações estatisticamente significativas entre a expressão do CD20+ e as demais características clínico-demográficas (**Tabela 14**), com os parâmetros histológicos (**Tabela 15**).



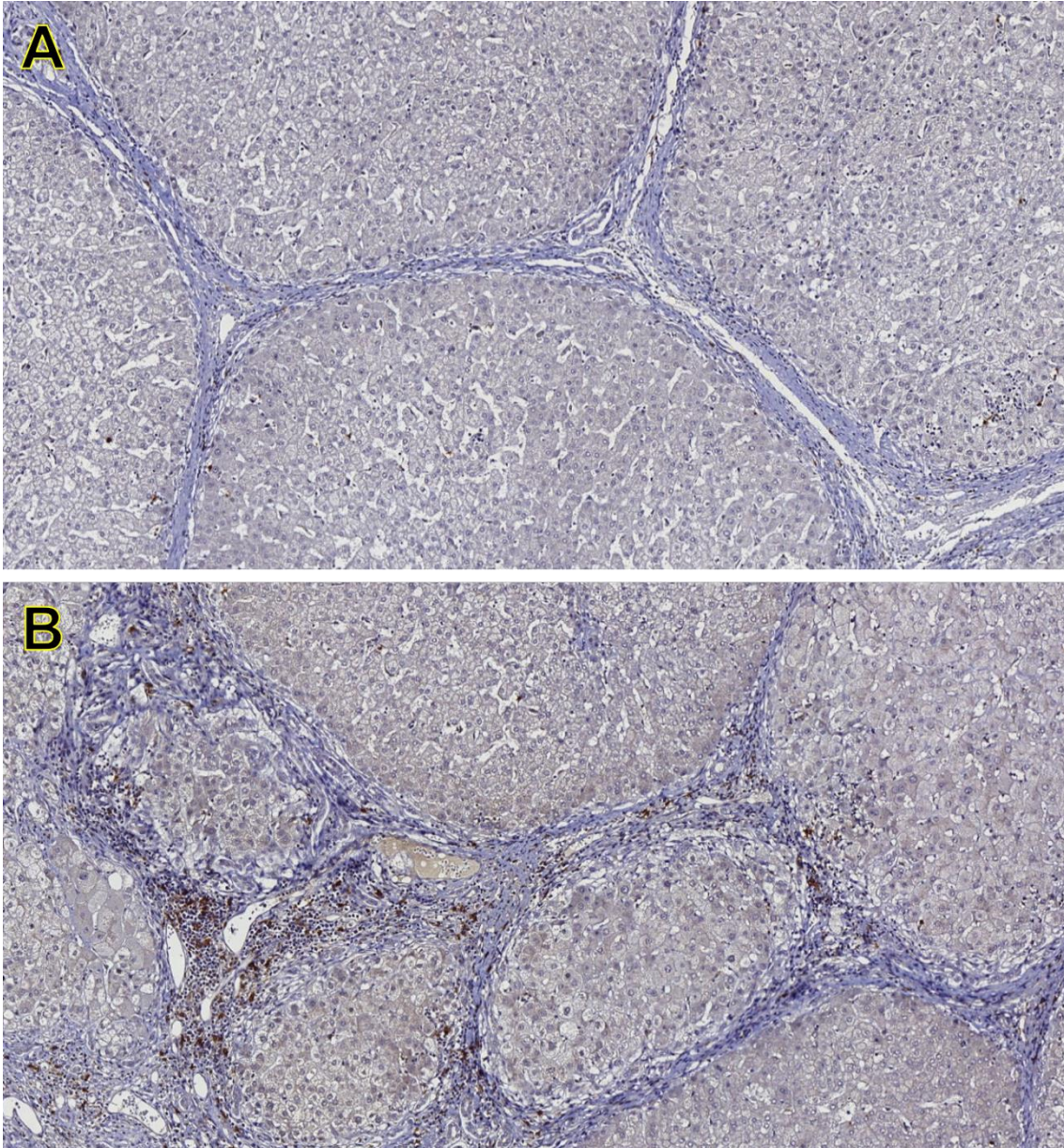


Figura 31. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD20+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 14.** Frequência da expressão de CD20+ entre as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD20+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Pacientes</b>					<b>0,029</b>
Não tratados	6	14,3	14	33,3	
Tratados	15	35,7	7	16,7	
<b>Sexo</b>					0,744
Masculino	13	31,0	15	35,7	
Feminino	8	19,0	6	14,3	
<b>Idade</b>					0,536
≤ 55 anos	11	26,2	8	19,0	
> 55 anos	10	23,8	13	31,0	

**Tabela 15.** Frequência da expressão de CD20+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD20+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Inflamação portal e septal</b>					0,774
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	5	11,9	4	9,5	
Grau 2	9	21,4	9	21,4	
Grau 3	7	16,7	7	16,7	
Grau 4	0	0,0	1	2,4	
<b>Atividade de interface</b>					0,129
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	8	19,0	2	4,8	
Grau 2	6	14,3	10	23,8	
Grau 3	7	16,7	8	19,0	
Grau 4	0	0,0	1	2,4	
<b>Necrose lítica focal</b>					0,076
Grau 0	1	2,4	0	0,0	
Grau 1	14	33,3	7	16,7	
Grau 2	5	11,9	13	31,0	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Necrose confluyente</b>					0,387
Grau 0	17	40,5	18	42,9	
Grau 1	2	4,8	2	4,8	
Grau 2	2	4,8	0	0,0	
Grau 3	0	0,0	1	2,4	
<b>Estadiamento de cirrose</b>					0,058
A	4	9,5	7	16,7	
B	10	23,8	13	31,0	
C	7	16,7	1	2,4	
<b>Regressão de fibrose</b>					0,116
Grau 0	2	4,8	5	11,9	
Grau 1	10	23,8	4	9,5	
Grau 2	9	21,4	10	23,8	
Grau 3	0	0,0	2	4,8	
<b>Esteatose</b>					0,208
Grau 0	19	45,2	15	35,7	
Grau 1	1	2,4	5	11,9	
Grau 2	1	2,4	1	2,4	
Grau 3	0	0,0	0	0,0	
<b>Balonização hepatocelular</b>					0,766
Grau 0	17	40,5	17	40,5	
Grau 1	3	7,1	2	4,8	
Grau 2	1	2,4	2	4,8	
<b>Esteato-hepatite</b>					1,000
0	20	47,6	19	45,2	
1	1	2,4	2	4,8	

### 5.5.2.2 Linfócitos CD3+ na interface septal

A **Figura 32** ilustra a expressão de linfócitos CD3+ na região da interface septal do tecido hepático. Entre os 42 casos, a variação da expressão deste marcador foi de 18,09 a 557,71 células positivas/mm<sup>2</sup>, e a mediana foi de 154,33 células positivas/mm<sup>2</sup>.

Entre o grupo de pacientes tratados, a variação da expressão de linfócitos CD3+ foi de 18,09 a 349,76 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 102,58 células positivas/mm<sup>2</sup>. Já no grupo de pacientes não tratados, a variação foi de 26,53 a 557,71 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 277,46 células positivas/mm<sup>2</sup>.

De acordo com a **Tabela 16**, 17 pacientes tratados (41,5%) apresentaram predomínio da baixa expressão de CD3+ e quatro (9,8%) apresentaram alta expressão.

No grupo de pacientes não tratados, cinco (12,2%) apresentaram baixa expressão de linfócitos CD3+ enquanto 15 (36,6%) apresentaram alta expressão de CD3+, diferença que se mostrou estatisticamente significativa ao teste estatístico qui-quadrado de Pearson ( $p = 0,001$ , **Tabela 16**). Não observamos associações estatisticamente significativas entre a expressão do CD3+ e as demais características clínico-demográficas (**Tabela 16**).

Quando comparamos a expressão de linfócitos CD3+ com as variáveis histológicas (**Tabela 17**), observamos uma associação estatisticamente significante entre a expressão de linfócitos CD3+ e as variáveis atividade de interface perisseptal ( $p = 0,028$ ; **Tabela 17**), necrose lítica focal ( $p = 0,009$ ; **Tabela 17**) e balonização hepatocelular ( $p = 0,033$ ; **Tabela 17**).

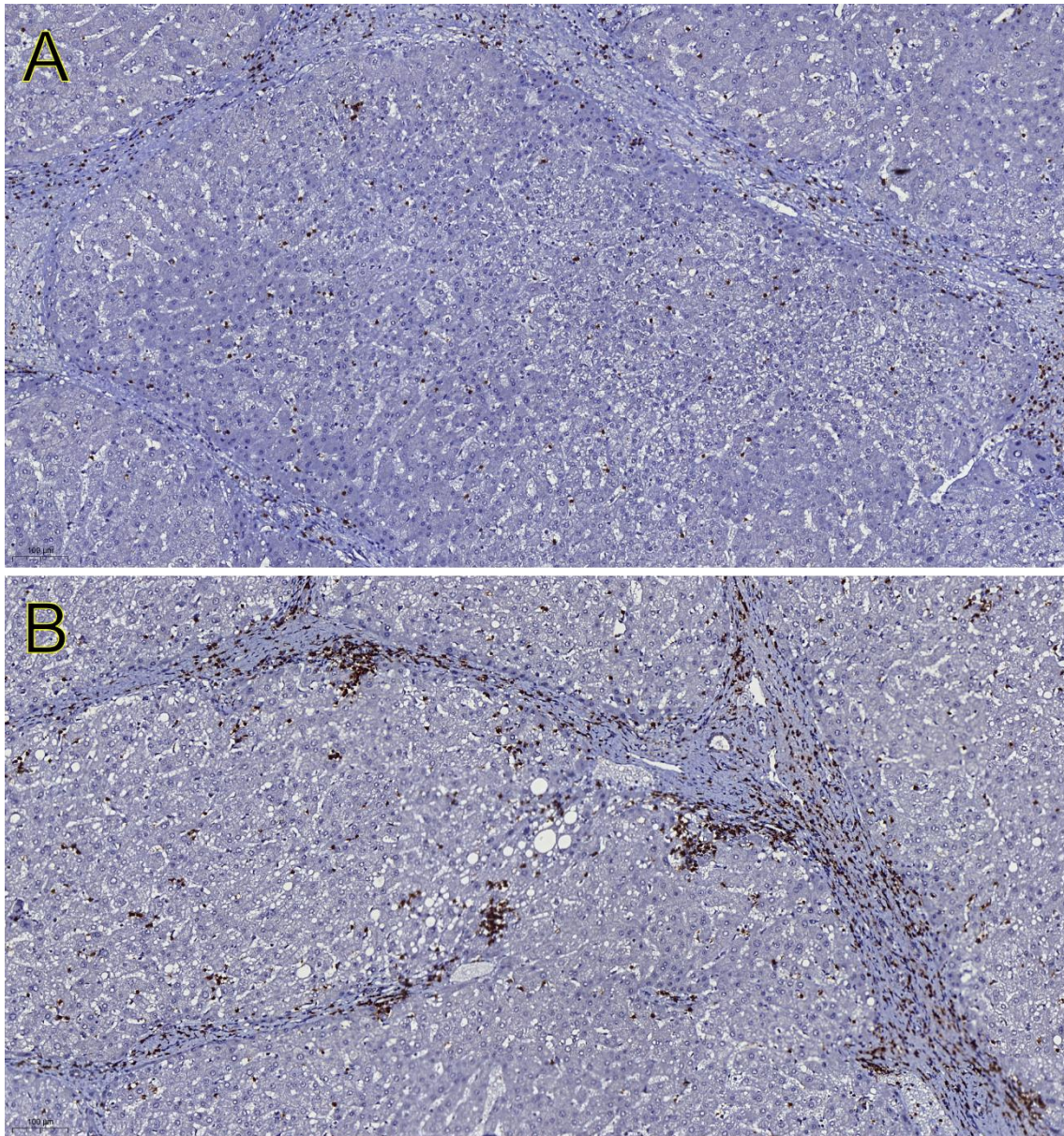


Figura 32. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD3+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 16.** Frequência da expressão de CD3+ entre as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD3+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )*				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Pacientes</b>					<b>0,001</b>
Não tratados	4	9,8	15	36,6	
Tratados	17	41,5	5	12,2	
<b>Sexo</b>					0,744
Masculino	13	31,7	14	34,1	
Feminino	8	19,5	6	14,6	
<b>Idade</b>					1,000
≤ 55 anos	9	22,0	9	22,0	
> 55 anos	12	29,3	11	26,8	

\*CD3 possui 1 caso omissos

**Tabela 17.** Frequência da expressão de CD3+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD3+ (células positivas/mm <sup>2</sup> ) *				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Inflamação portal e septal</b>					0,077
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	7	17,1	2	4,9	
Grau 2	10	24,4	7	17,1	
Grau 3	4	9,8	10	24,4	
Grau 4	0	0,0	1	2,4	
<b>Atividade de interface</b>					<b>0,028</b>
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	9	22,0	1	2,4	
Grau 2	5	12,2	10	24,4	
Grau 3	7	17,1	8	19,5	
Grau 4	0	0,0	1	2,4	
<b>Necrose lítica focal</b>					<b>0,009</b>
Grau 0	0	0,0	1	2,4	
Grau 1	16	39,0	5	12,2	
Grau 2	4	9,8	13	31,7	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Necrose confluyente</b>					0,342
Grau 0	18	43,9	17	41,5	
Grau 1	1	2,4	2	4,9	
Grau 2	2	4,9	0	0,0	
Grau 3	0	0,0	1	2,4	
<b>Estadiamento de cirrose</b>					0,688
A	6	14,6	5	12,2	
B	12	29,3	10	24,4	
C	3	7,3	5	12,2	
<b>Regressão de fibrose</b>					0,353
Grau 0	3	7,3	4	9,8	
Grau 1	5	12,2	9	22,0	
Grau 2	12	29,3	6	14,6	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Esteatose</b>					0,183
Grau 0	19	46,3	14	34,1	
Grau 1	1	2,4	5	12,2	
Grau 2	1	2,4	1	2,4	
Grau 3	0	0,0	0	0,0	
<b>Balonização hepatocelular</b>					<b>0,033</b>
Grau 0	20	48,8	13	31,7	
Grau 1	0	0,0	5	12,2	
Grau 2	1	2,4	2	4,9	
<b>Esteato-hepatite</b>					0,606
0	20	48,8	18	43,9	
1	1	2,4	2	4,9	

\*CD3 possui 1 caso omissos

### 5.5.2.3 Linfócitos CD4+ na interface septal

A **Figura 33** ilustra a expressão de linfócitos CD4+ na região da interface perisseptal do tecido hepático. A variação da expressão deste marcador entre os 42 casos foi de 1,52 a 274,49 células positivas/mm<sup>2</sup>, e a mediana foi de 41,75 células positivas/mm<sup>2</sup>.

Entre o grupo de pacientes tratados, a variação da expressão de linfócitos CD4+ foi de 1,52 a 146,66 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 24,16 células positivas/mm<sup>2</sup>. Já no grupo de pacientes não tratados a variação foi de 15,64 a 274,49 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 62,42 células positivas/mm<sup>2</sup>.

De acordo com a **Tabela 18**, 13 pacientes tratados (31,0%) apresentaram predomínio da baixa expressão de CD4+ e nove (21,4%) apresentaram alta expressão. No grupo de pacientes não tratados, 12 (28,6%) apresentaram alta expressão de CD4+ e oito (19,0%) apresentaram baixa expressão.

Tais achados demonstram o predomínio da baixa expressão de CD4+ nos pacientes tratados, enquanto nos pacientes não tratados os casos com alta expressão de CD4+ predominaram.

Através da análise de qui-quadrado de Pearson não houve diferença estatística significativa na detecção dos linfócitos CD4+ da interface perisseptal entre os grupos tratados ou não tratados ( $p = 0,354$ , **Tabela 18**).

Não observamos associação estatisticamente significativa entre a quantidade de linfócitos CD4+ e as demais características clínico-demográficas (**Tabela 18**), os parâmetros histológicos (**Tabela 19**).

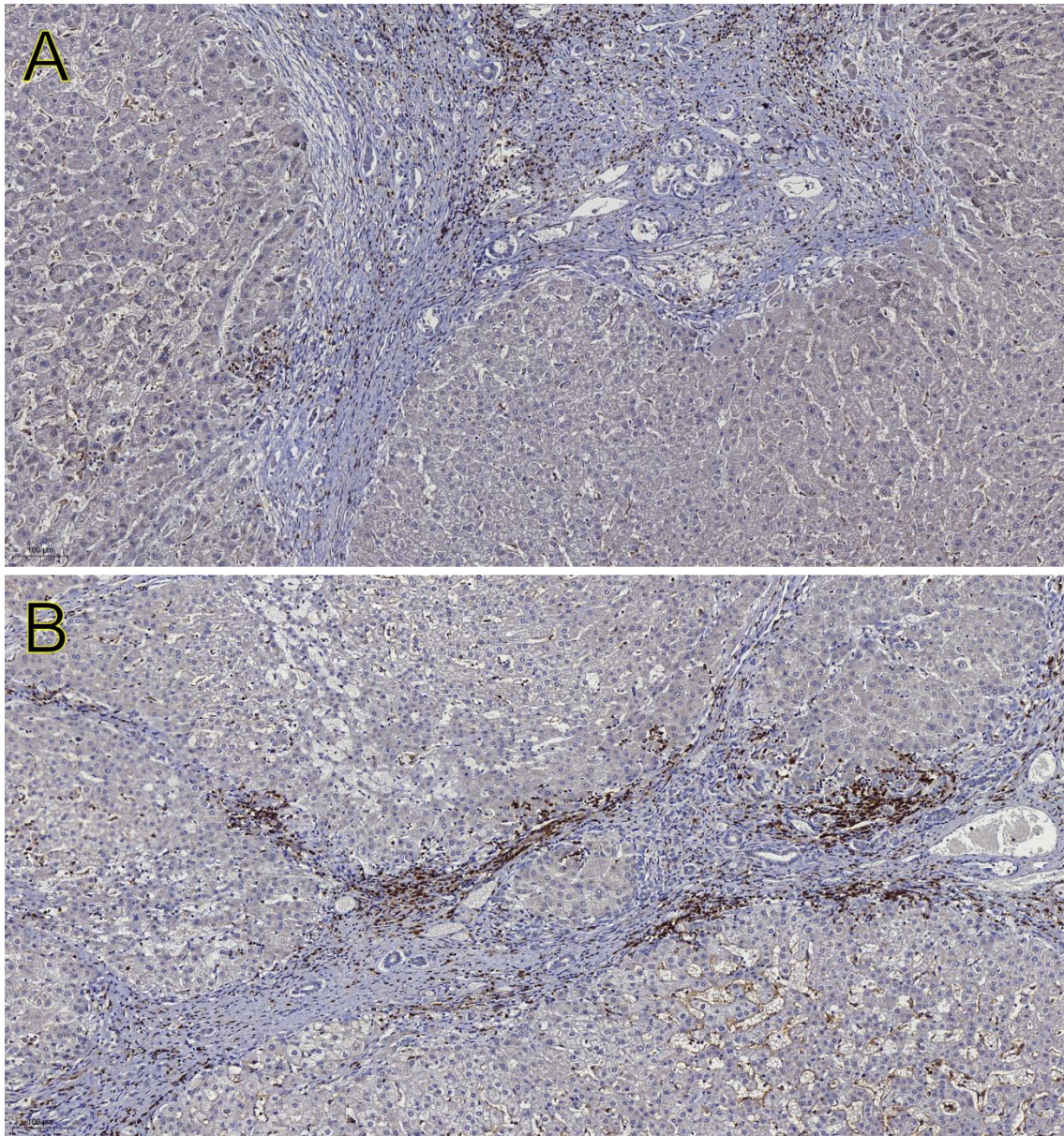


Figura 33. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD4+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 18.** Frequência da expressão de CD4+ em comparação com as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD4+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Pacientes</b>					0,354
Não tratados	8	19,0	12	28,6	
Tratados	13	31,0	9	21,4	
<b>Sexo</b>					0,744
Masculino	15	35,7	13	31,0	
Feminino	6	14,3	8	19,0	
<b>Idade</b>					1,000
≤ 55 anos	9	21,4	10	23,8	
> 55 anos	12	28,6	11	26,2	

**Tabela 19.** Frequência da expressão de CD4+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD4+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Inflamação portal e septal</b>					0,528
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	3	7,1	6	14,3	
Grau 2	10	23,8	8	19,0	
Grau 3	7	16,7	7	16,7	
Grau 4	1	2,4	0	0,0	
<b>Atividade de interface</b>					0,481
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	6	14,3	4	9,5	
Grau 2	6	14,3	10	23,8	
Grau 3	8	19,0	7	16,7	
Grau 4	1	2,4	0	0,0	
<b>Necrose lítica focal</b>					0,101
Grau 0	0	0,0	1	2,4	
Grau 1	14	33,3	7	16,7	
Grau 2	7	16,7	11	26,2	
Grau 3	0	0,0	2	4,8	
<b>Necrose confluyente</b>					0,154
Grau 0	19	45,2	16	38,1	
Grau 1	0	0,0	4	9,5	
Grau 2	1	2,4	1	2,4	
Grau 3	1	2,4	0	0,0	
<b>Estadiamento de cirrose</b>					0,206
A	3	7,1	8	19,0	
B	13	31,0	10	23,8	
C	5	11,9	3	7,1	
<b>Regressão de fibrose</b>					0,978
Grau 0	4	9,5	3	7,1	
Grau 1	7	16,7	7	16,7	
Grau 2	9	21,4	10	23,8	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Esteatose</b>					0,057
Grau 0	20	47,6	14	33,3	
Grau 1	1	2,4	5	11,9	
Grau 2	0	0,0	2	4,8	
Grau 3	0	0,0	0	0,0	
<b>Balonização hepatocelular</b>					0,053
Grau 0	20	47,6	14	33,3	
Grau 1	1	2,4	4	9,5	
Grau 2	0	0,0	3	7,1	
<b>Esteato-hepatite</b>					0,232
0	21	50,0	18	42,9	
1	0	0,0	3	7,1	



#### 5.5.2.4 Linfócitos CD8+ na interface septal

A **Figura 34** ilustra a expressão de linfócitos CD8+ na região da interface perisseptal do tecido hepático. A variação da expressão deste marcador entre os 42 casos foi de 39,54 a 719,18 células positivas/mm<sup>2</sup>, e a mediana foi de 285,59 células positivas/mm<sup>2</sup>.

Entre o grupo de pacientes tratados, a variação da quantidade de linfócitos CD8+ foi de 39,54 a 587,22 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 173,40 células positivas/mm<sup>2</sup>. Já no grupo de pacientes não tratados, a variação foi de 171,54 a 719,18 células positivas/mm<sup>2</sup>, com mediana de 365,05 células positivas/mm<sup>2</sup>.

De acordo com a **Tabela 20**, 16 pacientes tratados (38,1%) apresentaram predomínio da baixa expressão de CD8+ e seis (14,3%) apresentaram alta expressão. No grupo de pacientes não tratados, cinco (11,9%) apresentaram baixa expressão e 15 (35,7%) apresentaram alta expressão de CD8+.

Tais achados demonstram o predomínio da baixa expressão de CD8+ nos pacientes tratados, enquanto nos não tratados os casos com alta expressão de CD8+ predominaram, diferença que se mostrou estatisticamente significativa ao teste qui-quadrado ( $p = 0,005$ , **Tabela 20**).

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre a expressão do CD8+ e as demais características clínico-demográficas (**Tabela 20**) e parâmetros histológicos (**Tabela 21**). Embora o número de casos com alta expressão de linfócito CD8+ na interface tenha sido maior no grupo de maior atividade de interface (graus 2, 3 = 42,8%), estes números não mostraram qualquer tendência a significância.

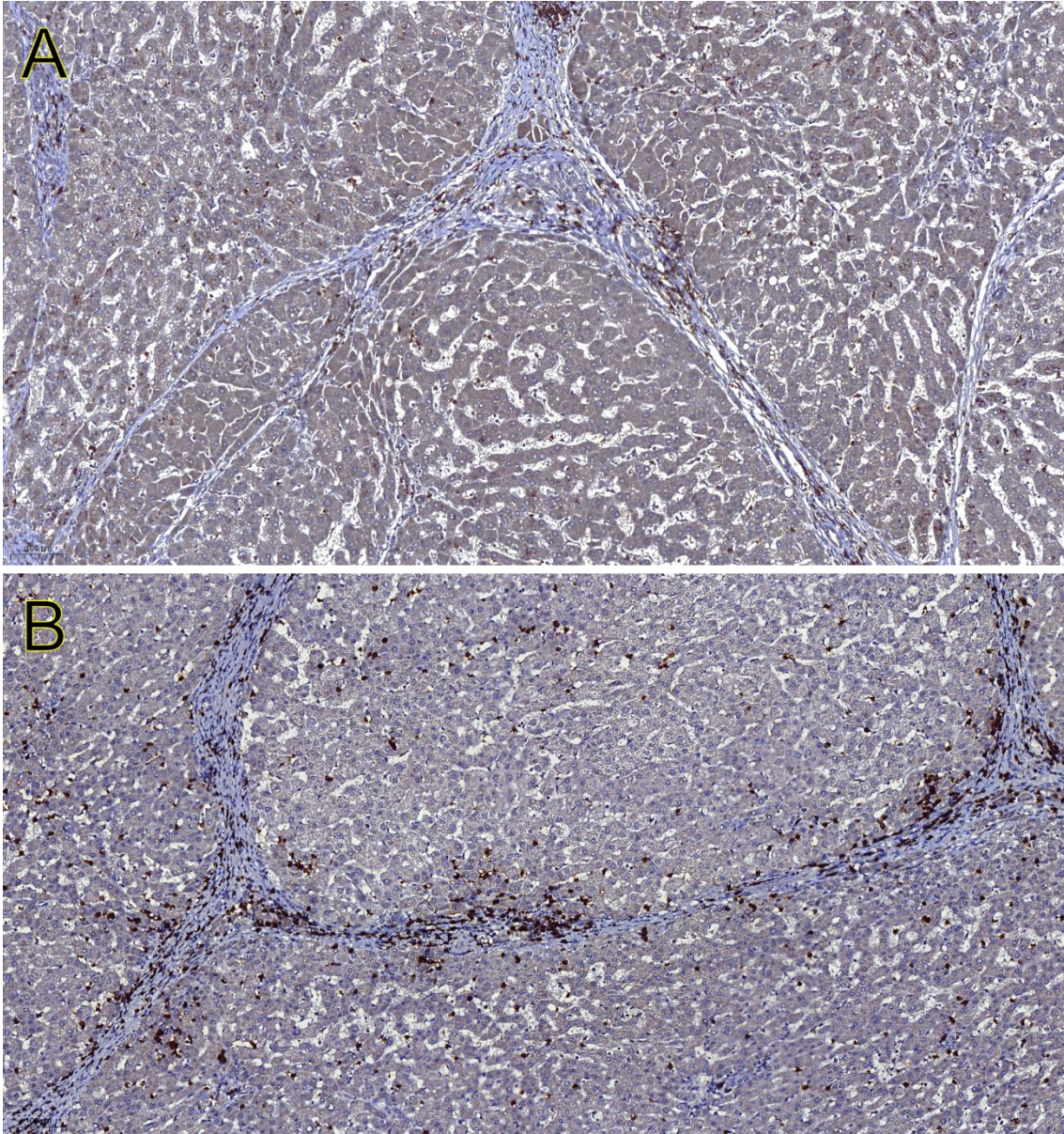


Figura 34. Imagem ilustrativa dos linfócitos CD8+ na região da interface perisseptal do tecido hepático em pacientes tratados (A) e não tratados (B). Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 20.** Frequência da expressão de CD8+ entre as características clínico-demográficas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD8+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Pacientes</b>					<b>0,005</b>
Não tratados	5	11,9	15	35,7	
Tratados	16	38,1	6	14,3	
<b>Sexo</b>					0,326
Masculino	12	28,6	16	38,1	
Feminino	9	21,4	5	11,9	
<b>Idade</b>					1,000
≤ 55 anos	10	23,8	9	21,4	
> 55 anos	11	26,2	12	28,6	

**Tabela 21.** Frequência da expressão de CD8+ entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica	CD8+ (células positivas/mm <sup>2</sup> )				P
	Baixa expressão		Alta expressão		
	N	%	N	%	
<b>Inflamação portal e septal</b>					0,474
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	6	14,3	3	7,1	
Grau 2	8	19,0	10	23,8	
Grau 3	6	14,3	8	19,0	
Grau 4	1	2,4	0	0,0	
<b>Atividade de interface</b>					0,327
Grau 0	0	0,0	0	0,0	
Grau 1	7	16,7	3	7,1	
Grau 2	7	16,7	9	21,4	
Grau 3	6	14,3	9	21,4	
Grau 4	1	2,4	0	0,0	
<b>Necrose lítica focal</b>					0,736
Grau 0	1	2,4	0	0,0	
Grau 1	11	26,2	10	23,8	
Grau 2	8	19,0	10	23,8	
Grau 3	1	2,4	1	2,4	
<b>Necrose confluyente</b>					0,794
Grau 0	17	40,5	18	42,9	
Grau 1	2	4,8	2	4,8	
Grau 2	1	2,4	1	2,4	
Grau 3	1	2,4	0	0,0	
<b>Estadiamento de cirrose</b>					0,204
A	6	14,3	5	11,9	
B	9	21,4	14	33,3	
C	6	14,3	2	4,8	
<b>Regressão de fibrose</b>					0,479
Grau 0	3	7,1	4	9,5	
Grau 1	8	19,0	6	14,3	
Grau 2	10	23,8	9	21,4	
Grau 3	0	0,0	2	4,8	
<b>Esteatose</b>					0,091
Grau 0	18	42,9	16	38,1	
Grau 1	1	2,4	5	11,9	
Grau 2	2	4,8	0	0,0	
Grau 3	0	0,0	0	0,0	
<b>Balonização hepatocelular</b>					0,766
Grau 0	17	40,5	17	40,5	
Grau 1	2	4,8	3	7,1	
Grau 2	2	4,8	1	2,4	
<b>Esteato-hepatite</b>					1,000
0	19	45,2	20	47,6	
1	2	4,8	1	2,4	

### 5.5.3 Análises semiquantitativas de linfócitos expressando PD-1 e FOXP3

#### 5.5.3.1 Semiquantificação da expressão da molécula coestimulatória negativa do checkpoint imune PD-1

As células imunomarcadas para PD-1+ na região da interface perisseptal foram raras em toda nossa casuística, impossibilitando a realização da análise quantitativa no software QuPath para esse marcador nesta região.

Realizamos a análise semiquantificativa da expressão de linfócitos PD-1+ nas regiões septal e centrolobular. Tais avaliações foram efetuadas como “informes indiretos” do possível estado de ativação ou exaustão de linfócitos. Os dados da semiquantificação para cada um dos 42 pacientes estão apresentados no **Anexo F**.

Conforme apresentado na **Tabela 22**, para a imunomarcção septal para PD-1 encontramos apenas nove casos tratados (22%) com células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0), e 12 (29,3%) com poucas células por vezes agrupadas (grau 1). No grupo de pacientes não tratados, para a imunomarcção septal para PD-1, encontramos oito casos (19,5%) apresentando células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0), e 12 (29,3%) com poucas células por vezes agrupadas (grau 1).

A imunoexpressão para PD-1, na região septal, em ambos os grupos demonstrou maior número casos classificados como poucas células por vezes agrupadas (grau 1). Assim, não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 1,000$ ; **Tabela 22**).

De acordo com a **Tabela 22**, para a imunomarcção centrolobular para PD-1 encontramos 21 pacientes tratados (51,2%) com células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0), não ocorrendo pacientes classificados com poucas células por vezes agrupadas (grau 1). No grupo de pacientes não tratados, para a imunomarcção centrolobular para PD-1, encontramos 17 casos (41,5%) com células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0) e apenas três (7,3%) com poucas células por vezes agrupadas (grau 1).

Para a região centrolobular, em ambos os grupos a maior parte dos casos apresentou células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0), não ocorrendo diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,107$ ; **Tabela 22**).

**Tabela 22.** Frequência da expressão de PD-1+ na região septal entre pacientes tratados e não tratados (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Região	Imunoexpressão de PD-1+ *				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<i>Septal</i>					1,000
Grau 1	9	22,0	8	19,5	
Grau 2	12	29,3	12	29,3	
<i>Centrolobular</i>					0,107
Grau 1	21	51,2	17	41,5	
Grau 2	0	0,0	3	7,3	

\*PD-1 apresenta 1 caso omissos

A **Figura 35** e **Figura 36** exemplificam nossos achados da imunomarcção para PD-1+ nas diferentes regiões avaliadas.

Quando correlacionamos a imunoexpressão de PD-1+, nas regiões septal e centrolobular, com as variáveis histológicas analisadas no presente estudo, não encontramos nenhuma relação estatisticamente significativa (**Tabela 23** e **Tabela 24**).

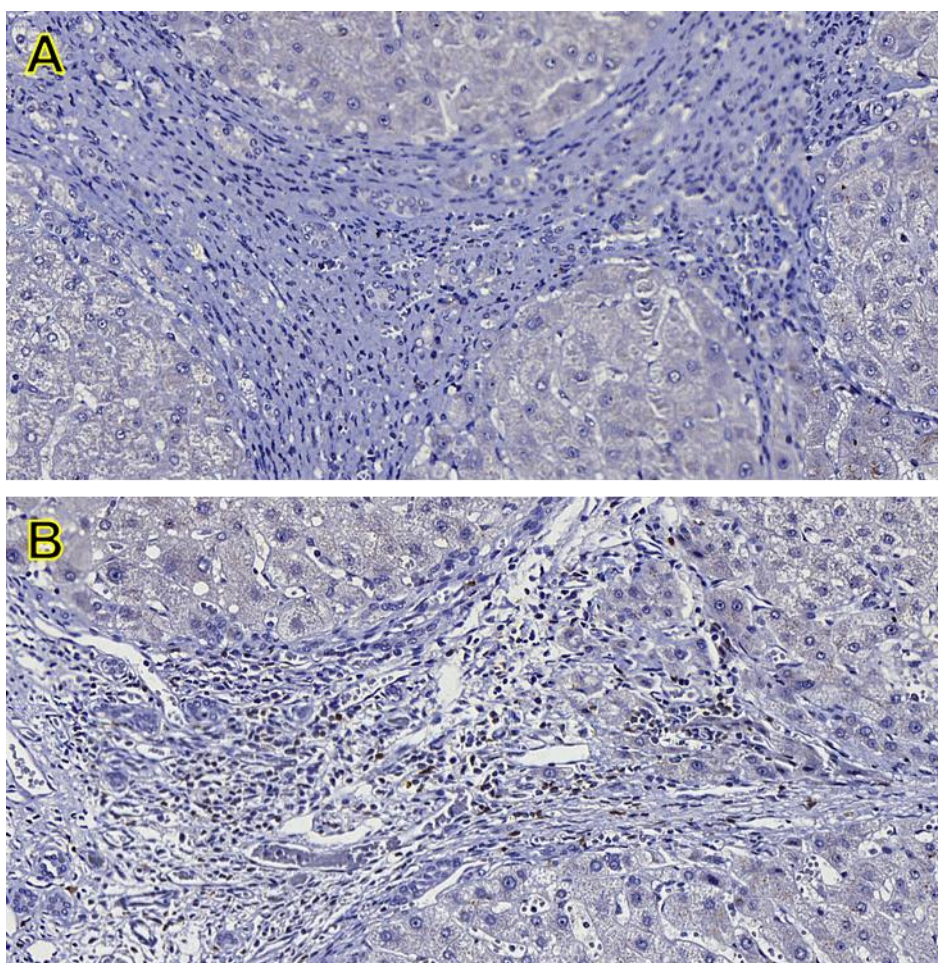


Figura 35. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoexpressão de PD-1 na região septal. (A) Grau 0 e (B) grau 1. Objetiva: 40x. Fonte: Elaborada pela autora.

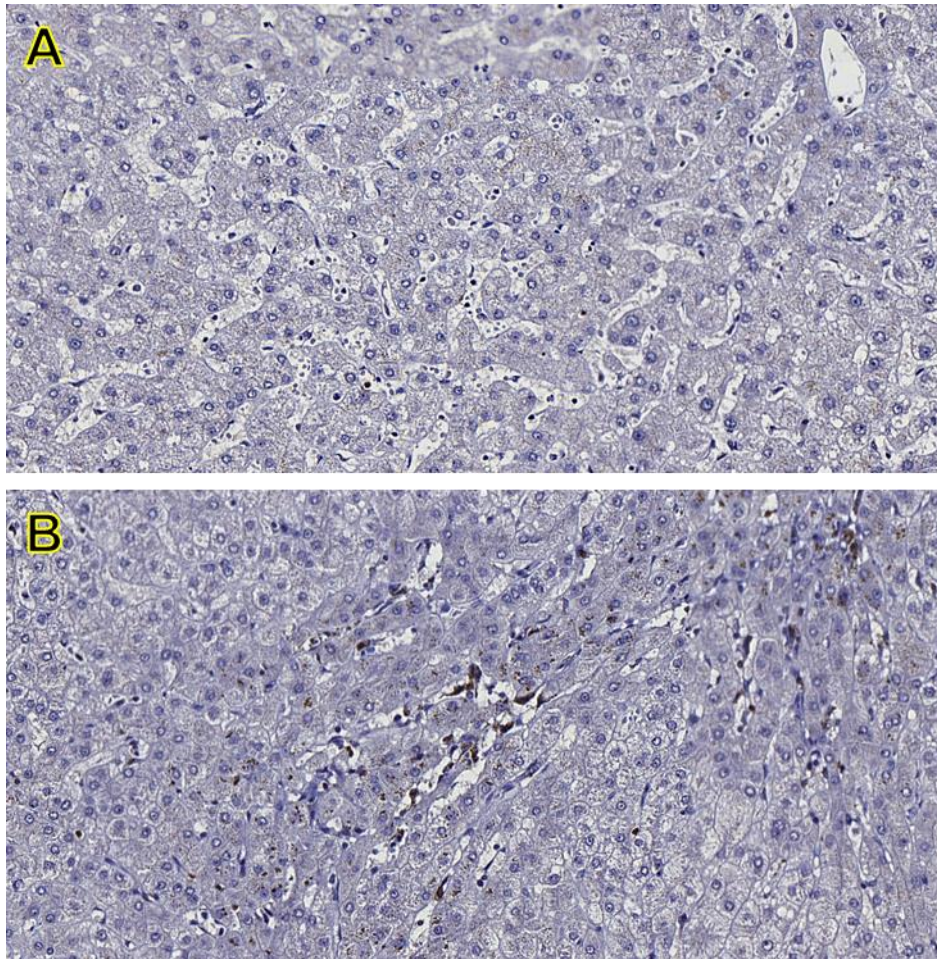


Figura 36. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunexpressão de PD-1 na região centrolobular. (A) Grau 0 e (B) grau 1. Objetiva: 40x. Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 23.** Frequência da expressão de PD-1+ na região septal entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica histológica	Imunoexpressão de PD-1+ na região septal *		P
	Grau 1	Grau 2	
<b>Inflamação portal e septal</b>			0,154
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	5 (12,2%)	3 (7,3%)	
Grau 2	8 (19,5%)	10 (24,4%)	
Grau 3	3 (7,3%)	11 (26,8%)	
Grau 4	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Atividade de interface</b>			0,303
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	6 (14,6%)	4 (9,8%)	
Grau 2	5 (12,2%)	10 (24,4%)	
Grau 3	5 (12,2%)	10 (24,4%)	
Grau 4	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose lítica focal</b>			0,161
Grau 0	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
Grau 1	12 (29,3%)	9 (22,0%)	
Grau 2	4 (9,8%)	13 (31,7%)	
Grau 3	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
<b>Necrose confluyente</b>			0,399
Grau 0	14 (34,1%)	20 (48,8%)	
Grau 1	2 (4,9%)	2 (4,9%)	
Grau 2	0 (0,0%)	2 (4,9%)	
Grau 3	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Estadiamento de cirrose</b>			0,939
A	5 (12,2%)	6 (14,6%)	
B	9 (22,0%)	13 (31,7%)	
C	3 (7,3%)	5 (12,2%)	
<b>Regressão de fibrose</b>			0,736
Grau 0	2 (4,9%)	5 (12,2%)	
Grau 1	5 (12,2%)	9 (22,0%)	
Grau 2	9 (22,0%)	9 (22,0%)	
Grau 3	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
<b>Esteatose</b>			0,889
Grau 0	14 (34,1%)	19 (46,3%)	
Grau 1	2 (4,9%)	4 (9,8%)	
Grau 2	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Balonização hepatocelular</b>			0,536
0	15 (36,6%)	18 (43,9%)	
1	1 (2,4%)	4 (9,8%)	
2	1 (2,4%)	2 (4,9%)	
<b>Esteato-hepatite</b>			1,000
Ausente	16 (39,0%)	22 (53,7%)	
Presente	1 (2,4%)	2 (4,9%)	

\*PD-1 apresenta 1 caso omissos

**Tabela 24.** Frequência da expressão de PD-1+ na região centrolobular entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica histológica	Imunoexpressão de PD-1+ na região centrolobular *		P
	Grau 1	Grau 2	
<b>Inflamação portal e septal</b>			0,247
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	8 (19,5%)	0 (0,0%)	
Grau 2	15 (36,6%)	3 (7,3%)	
Grau 3	14 (34,1%)	0 (0,0%)	
Grau 4	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Atividade de interface</b>			0,132
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	10 (24,4%)	0 (0,0%)	
Grau 2	12 (29,3%)	3 (7,3%)	
Grau 3	15 (36,6%)	0 (0,0%)	
Grau 4	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose lítica focal</b>			0,932
Grau 0	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
Grau 1	19 (46,3%)	2 (4,9%)	
Grau 2	16 (39,0%)	1 (2,4%)	
Grau 3	2 (4,9%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose confluyente</b>			0,881
Grau 0	31 (75,6%)	3 (7,3%)	
Grau 1	4 (9,8%)	0 (0,0%)	
Grau 2	2 (4,9%)	0 (0,0%)	
Grau 3	1 (2,4%)	0 (0,0%)	
<b>Estadiamento de cirrose</b>			0,675
A	10 (24,4%)	1 (2,4%)	
B	20 (48,8%)	2 (4,9%)	
C	8 (19,5%)	0 (0,0%)	
<b>Regressão de fibrose</b>			0,616
Grau 0	7 (17,1%)	0 (0,0%)	
Grau 1	12 (29,3%)	2 (4,9%)	
Grau 2	17 (41,5%)	1 (2,4%)	
Grau 3	2 (4,9%)	0 (0,0%)	
<b>Esteatose</b>			0,604
Grau 0	31 (75,6%)	2 (4,9%)	
Grau 1	5 (12,2%)	1 (2,4%)	
Grau 2	2 (4,9%)	0 (0,0%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Balonização hepatocelular</b>			0,177
0	31 (75,6%)	2 (4,9%)	
1	5 (12,2%)	0 (0,0%)	
2	2 (4,9%)	1 (2,4%)	
<b>Esteato-hepatite</b>			0,209
Ausente	36 (87,8%)	2 (4,9%)	
Presente	2 (4,9%)	1 (2,4%)	

\*PD-1 apresenta 1 caso omissos



### 5.5.3.2 *Semiquantificação do fator de transcrição FOX-P3*

As células imunomarcadas para o fator de transcrição FOX-P3 na região da interface perisseptal foram raras em toda nossa casuística, impossibilitando a realização da análise quantitativa no software QuPath para esse marcador nesta região.

Realizamos a análise semiquantificativa da expressão de linfócitos FOX-P3+ nas regiões septal e centrolobular. Tais avaliações foram efetuadas como “informes indiretos” do possível estado de ativação ou exaustão de linfócitos. Os dados da semiquantificação para cada um dos 42 pacientes estão apresentados no **Anexo F**.

Conforme exibido na **Tabela 25**, para a imunomarcação septal para FOX-P3 encontramos: apenas nove casos tratados (22,5%) com células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0), e 11 (27,5%) apresentando poucas células por vezes agrupadas (grau 1). No grupo de pacientes não tratados, a imunomarcação septal para FOX-P3 foi ausente ou presente em células escassas e isoladas (grau 0) em 14 casos (35%), enquanto seis (15%) apresentaram poucas células por vezes agrupadas (grau 1).

A imunoexpressão para FOX-P3 na região septal demonstrou entre os pacientes tratados maior número de casos classificados como poucas células por vezes agrupadas (grau 1). Entre os pacientes não tratados, encontramos um maior número de casos apresentando células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0). Não houve, diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 0,200$ ; **Tabela 25**).

Conforme pode ser observado na **Tabela 25**, para a imunomarcação centrilobular para FOX-P3, encontramos 16 pacientes tratados (40%) com células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0) e quatro (10%) com poucas células por vezes agrupadas (grau 1). No grupo de pacientes não tratados, para a imunomarcação centrilobular para FOX-P3, encontramos 17 casos (41,4%) com células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0) e apenas três (7,3%) com poucas células por vezes agrupadas (grau 1).

Para a região centrilobular, em ambos os grupos a maior parte dos casos apresentou células ausentes ou escassas e isoladas (grau 0), não ocorrendo diferença estatística significativa entre os grupos ( $p = 1,000$ ; **Tabela 25**).

A **Figura 37** e **Figura 38** exemplificam nossos achados da imunomarcação para FOX-P3 nas diferentes regiões avaliadas. Não houve nenhuma relação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão de FOX-P3 nas regiões septal e centrolobular, com as variáveis histológicas analisadas no presente estudo (**Tabela 26** e **Tabela 27**).

**Tabela 25.** Frequência da expressão de FOX-P3 na região septal entre pacientes tratados e não tratados (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Região	Imunoexpressão de FOX-P3 *				P
	Pacientes tratados		Pacientes não tratados		
	N	%	N	%	
<i>Septal</i>					0,200
Grau 1	9	22,5	14	35,0	
Grau 2	11	27,5	6	15,0	
<i>Centrolobular</i>					1,000
Grau 1	16	40,0	17	42,5	
Grau 2	4	10,0	3	7,5	

\*FOX-P3 apresenta 2 casos omissos

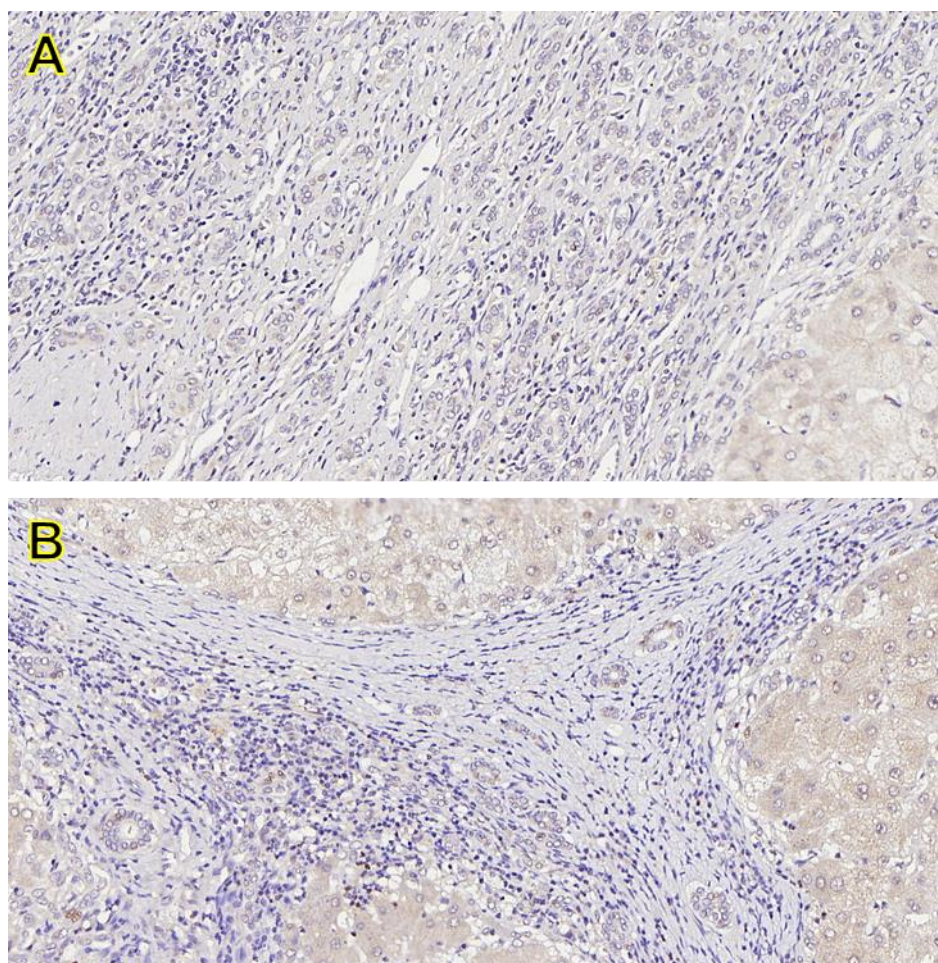


Figura 37. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoexpressão de FOX-P3 na região septal. (A) Grau 0 e (B) grau 1. Objetiva: 40x. Fonte: Elaborada pela autora.

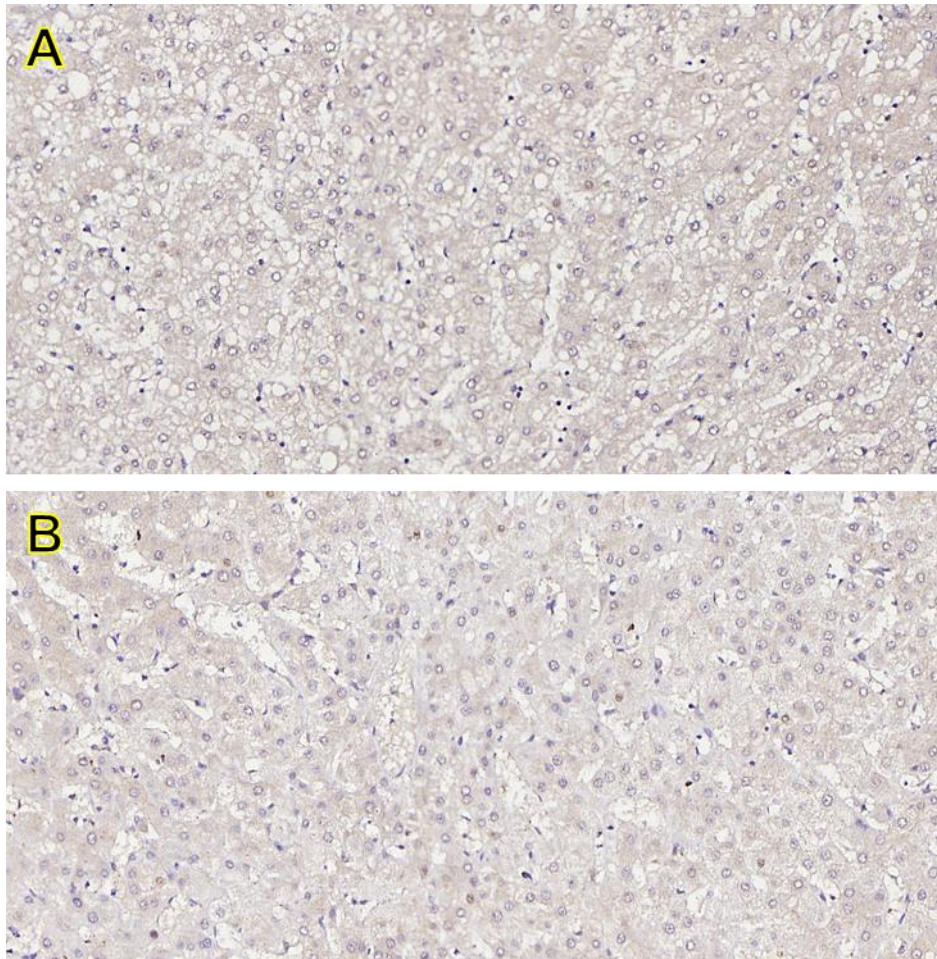


Figura 38. Exemplificação dos diferentes graus avaliados para a imunoposição de FOXP-3 na região centrilobular. (A) Grau 0 e (B) grau 1. Objetiva: 40x. Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 26.** Frequência da expressão de FOX-P3 na região septal entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica histológica	Imunoexpressão de FOX-P3 na região septal *		P
	Grau 1	Grau 2	
<b>Inflamação portal e septal</b>			0,356
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	4 (10,0%)	5 (12,5%)	
Grau 2	12 (30,0%)	5 (12,5%)	
Grau 3	6 (15,0%)	7 (17,5%)	
Grau 4	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
<b>Atividade de interface</b>			0,524
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	4 (10,0%)	6 (15,0%)	
Grau 2	10 (25,0%)	6 (15,0%)	
Grau 3	8 (20,0%)	5 (12,5%)	
Grau 4	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose lítica focal</b>			0,277
Grau 0	0 (0,0%)	1 (2,4%)	
Grau 1	12 (29,3%)	9 (22,0%)	
Grau 2	4 (9,8%)	13 (31,7%)	
Grau 3	1 (2,4%)	1 (2,4%)	
<b>Necrose confluyente</b>			0,349
Grau 0	18 (45,0%)	16 (40,0%)	
Grau 1	3 (7,5%)	0 (0,0%)	
Grau 2	1 (2,5%)	1 (2,5%)	
Grau 3	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
<b>Estadiamento de cirrose</b>			0,637
A	5 (12,5%)	6 (15,0%)	
B	13 (32,5%)	8 (20,0%)	
C	5 (12,5%)	3 (7,5%)	
<b>Regressão de fibrose</b>			0,822
Grau 0	3 (7,5%)	4 (10,0%)	
Grau 1	7 (17,5%)	5 (12,5%)	
Grau 2	12 (30,0%)	7 (17,5%)	
Grau 3	1 (2,5%)	1 (2,5%)	
<b>Esteatose</b>			0,872
Grau 0	18 (45,0%)	14 (35,0%)	
Grau 1	4 (10,0%)	2 (5,0%)	
Grau 2	1 (2,5%)	1 (2,5%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Balonização hepatocelular</b>			0,907
0	19 (47,5%)	14 (35,0%)	
1	2 (5,0%)	2 (5,0%)	
2	2 (5,0%)	1 (2,5%)	
<b>Esteato-hepatite</b>			1,000
Ausente	21 (52,5%)	16 (40,0%)	
Presente	2 (5,0%)	1 (2,5%)	

\*FOX-P3 apresenta 2 casos omissos

**Tabela 27.** Frequência da expressão de FOX-P3 na região centrolobular entre as características histológicas (N = 42; Qui-quadrado de Pearson).

Característica histológica	Imunoexpressão de FOX-P3 na região centrolobular *		P
	Grau 1	Grau 2	
<b>Inflamação portal e septal</b>			0,817
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	8 (20,0%)	1 (2,5%)	
Grau 2	13 (32,5%)	4 (10,0%)	
Grau 3	11 (27,5%)	2 (5,0%)	
Grau 4	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
<b>Atividade de interface</b>			0,958
Grau 0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Grau 1	8 (20,0%)	2 (5,0%)	
Grau 2	13 (32,5%)	3 (7,5%)	
Grau 3	11 (27,5%)	2 (5,0%)	
Grau 4	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose lítica focal</b>			0,614
Grau 0	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
Grau 1	15 (37,5%)	5 (12,5%)	
Grau 2	15 (37,5%)	2 (5,0%)	
Grau 3	2 (5,0%)	0 (0,0%)	
<b>Necrose confluyente</b>			0,510
Grau 0	28 (70,0%)	6 (15,0%)	
Grau 1	3 (7,5%)	0 (0,0%)	
Grau 2	1 (2,5%)	1 (2,5%)	
Grau 3	1 (2,5%)	0 (0,0%)	
<b>Estadiamento de cirrose</b>			0,534
A	10 (25,0%)	1 (2,5%)	
B	16 (40,0%)	5 (12,5%)	
C	7 (17,5%)	1 (2,5%)	
<b>Regressão de fibrose</b>			0,440
Grau 0	5 (12,5%)	2 (5,0%)	
Grau 1	10 (25,0%)	2 (5,0%)	
Grau 2	17 (42,5%)	2 (5,0%)	
Grau 3	1 (2,5%)	1 (2,5%)	
<b>Esteatose</b>			0,346
Grau 0	25 (62,5%)	7 (17,5%)	
Grau 1	6 (15,0%)	0 (0,0%)	
Grau 2	2 (5,0%)	0 (0,0%)	
Grau 3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Balonização hepatocelular</b>			0,669
0	27 (67,5%)	6 (15,0%)	
1	3 (7,5%)	1 (2,5%)	
2	3 (7,5%)	0 (0,0%)	
<b>Esteato-hepatite</b>			1,000
Ausente	30 (75,0%)	7 (17,5%)	
Presente	3 (7,5%)	0 (0,0%)	

\*FOX-P3 apresenta 2 casos omissos

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Estudo histológico

O advento das drogas antivirais de ação direta (DAAs) sobre o vírus da hepatite C representa um dos maiores avanços da medicina atual no tratamento da infecção crônica pelo HCV. São medicações com diversos benefícios, como alta eficácia e índices de resposta virológica sustentada (RVS) acima de 95%, com mínimos efeitos colaterais, curta duração do tratamento (8–12 semanas) e fácil regime de administração por via oral [2]. Essas medicações permitem tratar quase toda a população infectada, incluindo casos com cirrose avançada e comorbidades graves associadas, mantendo sempre uma elevada eficácia [271].

O HCV altera a homeostase hepática, levando ao estresse oxidativo e à inflamação [272]. O objetivo da terapia é erradicar o vírus e atingir RVS, que é definida como níveis indetectáveis de RNA-HCV de três a seis meses após o final do tratamento [34, 35]. Há evidências que demonstram que a obtenção de RVS após o tratamento com DAAs se associa a menor morbidade e melhora da qualidade de vida [273]. Os DAAs de primeira geração (boceprevir e telaprevir) foram introduzidos entre 2011 e 2013, sendo este o ano em que o sofosbuvir (SOF), um inibidor altamente potente da proteína não estrutural 5B (NS5B) polimerase, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Isso inaugurou a série de DAAs de segunda geração, permitindo o desenvolvimento de estratégias para a terapia do HCV consideravelmente mais eficientes do que os sistemas com IFN e ribavirina, as únicas alternativas de tratamento disponíveis até então [274]. A partir daí, as combinações dessas medicações se mostraram altamente eficazes em todos os genótipos (pangenotípicas), com bons perfis de segurança e tolerabilidade [275]. Entretanto, cerca de 3 a 5% dos pacientes não adquirem RVS apesar da suscetibilidade viral. Não está claro se fatores do hospedeiro possam contribuir para a falha do tratamento, embora a imunidade inata e a adaptativa possam estar envolvidas [276].

O sucesso do tratamento com os DAAs tem minimizado as consequências clínicas, levando à diminuição no número de biópsias, o que repercute em diminuição de amostras de tecido que permitem que os patologistas possam melhor estudar o impacto dessas medicações sobre os efeitos na necroinflamação, fibrose e distribuição de células inflamatórias.

O presente trabalho teve como objetivo promover análise da repercussão histológica e distribuição de células do microambiente hepático após o tratamento com DAAs naqueles que atingiram o clearance viral e comparar a pacientes não tratados. Foram selecionadas 42 amostras de espécimes de explante hepático (66,7% homens e 33,3 % mulheres), com idade média de 55 anos. As amostras foram coletadas da Divisão de Anatomia Patológica – HC-FMUSP, no período entre 2016 e 2021, obtidas de pacientes do Serviço de Transplantes de Fígado e Órgãos do Aparelho Digestivo, Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia HC-FMUSP. Todos os pacientes apresentavam o diagnóstico de hepatite C crônica e cirrose hepática, e escore de MELD indicando transplante hepático. Foram 20 pacientes não tratados e 22 pacientes previamente tratados com sucesso virológico com DAAs, nos quais avaliamos aspectos histológicos e imuno-histoquímicos.

Demonstramos significativa melhora da inflamação, bem como redução da atividade de interface nos pacientes tratados com DAAs. De outra parte, é importante salientar a comprovação, nessa casuística de pacientes transplantados, a persistência de relevantes evidências de inflamação crônica, destacando a permanência das lesões histológicas mesmo com a eliminação dos vírus. Consideramos que uma possível explicação para a persistência das alterações histológicas é que a infecção crônica pelo HCV possa induzir uma resposta imune disfuncional, que permaneça ativa apesar da erradicação do vírus.

Nossos achados não demonstraram diminuição significativa no grau de fibrose após o tratamento com DAAs. Devemos salientar que o diagnóstico de cirrose foi um critério de inclusão para este estudo e para a indicação do transplante, sendo o estadiamento de fibrose 4B o mais frequentemente identificado em ambos os grupos, (54,8%). Avaliando os critérios histológicos propostos por Wanless, como indicadores de regressão de fibrose, verificamos evidências de regressão da fibrose em 45,3% dos casos tratados, não diferindo do que observamos nos explantes de pacientes cirróticos não tratados com os DAAs (38,1%).

Poucos autores publicaram estudos histológicos centrados na análise da inflamação e de evidências de regressão da fibrose em pacientes que apresentaram RVS após tratamento com DAAs [4-6]. Uma das principais hipóteses levantadas pelo encontro de inflamação e lesão hepatocelular, e falta da regressão da fibrose nas amostras de explantes de pacientes com RVS pós-tratamento com DAAs, é o curto intervalo do tempo entre o tratamento antiviral e o transplante. Observamos que a melhora da

necroinflamação foi mais evidente nos casos com mais tempo entre o tratamento e o transplante, sugerindo que as lesões inflamatórias possivelmente reduzam ao longo do tempo decorrido após a eliminação do vírus. Ressaltamos que, mesmo partindo de um universo grande de casos de cirrose de HVC transplantados no HC-FMUSP, os critérios de inclusão e exclusão necessariamente exigentes levaram à redução do tamanho da nossa amostra, com 22 pacientes tratados, o que impossibilitou a análise estatística quando dividimos pelo tempo de tratamento. Contudo, observamos que a melhora necroinflamatória foi mais evidente nos casos com intervalo de 12 meses ou mais do tratamento até o transplante, e estudos futuros com maior casuística poderão melhor abordar nossa hipótese que a importância do tempo seja até mais evidente na regressão da fibrose.

Uma outra comparação possível é a análise de biópsias de pacientes que atingiram RVS com os esquemas de tratamento antiviral anteriores, especialmente aqueles baseados na associação de diversos tipos de interferon com ribavirina. Nossos achados de melhora das alterações necroinflamatórias foram similares a estudos anteriores comparando biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica antes e após o tratamento, indicando melhora nos escores de inflamação e até fibrose após a RVS [277, 278]. Tsubota e colaboradores encontraram significativa reversão da necroinflamação em biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica tratados com IFN, com a melhora histológica de maneira dependente do tempo [279]. Tsuda e colaboradores demonstraram, em biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica após terapia eficaz com IFN, que, apesar da melhora histológica ter sido significativa, a inflamação leve persistiu em 87% dos pacientes, mesmo após mais de quatro anos da terapia [280]. Um estudo de cinco anos, com 49 biópsias pré-tratamento e biópsias de acompanhamento pós-tratamento de pacientes com hepatite C crônica, mostrou que 92% dos pacientes obtiveram redução no escore combinado de inflamação após quatro anos [277]. Outro estudo, que relata mudanças a longo prazo na histologia hepática após o tratamento da hepatite C crônica, mostrou que pacientes com RVS obtiveram declínio significativo na inflamação [281]. Um estudo longo com pacientes com hepatite C crônica, que analisou amostras pareadas, com intervalo médio entre as biópsias hepáticas de 93 meses, revelou que 71% dos pacientes tratados com IFN e ribavirina obtiveram melhora da inflamação, enquanto 23% deles pioraram [282]. Podemos dizer que todos esses estudos apresentaram informações relativamente semelhantes, demonstrando que a inflamação histológica em pacientes com



hepatite C com RVS+ apresenta melhora significativa após acompanhamento a longo prazo.

Entretanto, há relatos descrevendo inflamação hepática persistente e/ou progressão para cirrose apesar da RVS [282]. Na era dos DAAs, Whitcomb e colaboradores, em uma análise retrospectiva com 65 espécimes de biópsia de pacientes com infecção recorrente por HCV no pós transplante hepático, demonstraram em um número substancial de pacientes (45,69%) a permanência das alterações histológicas associadas a infecção ativa e reportaram uma modulação imune menor sobre a regressão da fibrose em pacientes cirróticos, sendo evidenciado em 15% deles a progressão da fibrose após terapia bem-sucedida com IFN e ribavirina ou DAAs [4]. Em 2018, Putra e colaboradores [5] demonstraram em espécimes de explante hepático de 58 pacientes portadores de hepatite C crônica, a persistência de algum grau de atividade necroinflamatória nos pacientes tratados com sucesso com DAAs. A maioria dos pacientes tratados (72%) apresentou mínima atividade necroinflamatória. Entretanto, proporção similar foi observada nos casos não tratados (60.6%). Ressaltando que, após aproximadamente 24 semanas do tratamento, apenas 20% dos 25 explantes de pacientes tratados mostraram evidência histológica de regressão da fibrose. Assim, aqueles autores consideraram o tempo de tratamento antiviral como provável fator determinante na melhora histológica e regressão da fibrose [5].

A redução da fibrose, após terapia com IFN e ribavirina, também havia sido relatada em diversos estudos clínicos, já que naquela ocasião a biópsia era amplamente indicada para monitoramento da eficácia terapêutica [277, 282].

Em estudo anterior realizado por nosso grupo, Mendes et al [283] avaliaram 112 pacientes com hepatite C crônica submetidos a duas biópsias, 79 submetidos a tratamento antiviral com IFN + ribavirina e 33 não tratados. A progressão da fibrose foi significativamente maior no grupo não tratado. Importa reconhecer que, mesmo nos pacientes tratados que não obtiveram RVS, os índices de progressão da fibrose foram intermediários, significativamente inferior ao do grupo não tratado [283].

A ampla disponibilidade de amostras colhidas por biópsia pós-tratamento permitiu, inclusive, que alguns grandes ensaios clínicos detectassem uma minoria de pacientes mantendo o nível de fibrose e até progredindo para cirrose, apesar de atingir RVS, levantando, desde aquela época, a hipótese de que a inflamação e os distúrbios arquiteturais, além de despertados pela presença do HCV, pudessem se manter ou até ser perpetuados por outros fatores, extrínsecos ou relacionados ao fígado e/ou a fatores da

resposta inflamatória sistêmica do próprio paciente [278, 284]. É importante reconhecer que tais resultados foram obtidos de estudos clínicos com IFN e ribavirina, e relatos do efeito dos DAAs na fibrose em pacientes com hepatite C crônica ainda são poucos.

Na era dos DAAs, a melhora histológica foi recentemente descrita por Celli e colaboradores [6], em 2021, que analisaram 96 pacientes divididos em quatro grupos, diferenciados pela presença ou ausência de RVS e CHC, e compararam os grupos com relação ao grau de inflamação histológica e fibrose. Alto grau de inflamação foi observado mais comumente nos pacientes não tratados comparado àqueles tratados com DAAs (53% versus 29%). Nesse estudo, não houve diferença significativa no grau de fibrose [6]. Huang et al. [285], em recente análise retrospectiva de 38 biópsias pareadas pré e pós-tratamento antiviral de pacientes com hepatite C crônica, demonstraram significativa melhora da necroinflamação (82%), além de remissão parcial da fibrose (37%) cerca de seis meses após a terapia com DAA.

Em conjunto, nossos achados concordam com os poucos relatos recentes de estudos histopatológicos em explantes de pacientes com RVS obtida por tratamento com DAAs demonstrando persistência de evidências de inflamação crônica, inclusive com atividade de interface, reconhecendo a tendência de sua redução ao longo do tempo. Muitos desses achados são similares aos relatados nas biópsias de pacientes que haviam atingido RVS mediante esquemas terapêuticos anteriormente utilizados. Estudos futuros, com casuísticas maiores, acompanhados por maior tempo, poderão melhor abordar a causa da persistência da inflamação, levantando especialmente às hipóteses de que o HCV desperte exposição de neoantígenos hepatocitários que induzam a resposta autoimune e que se perpetuem mesmo após a RVS, ou que surjam comorbidades como esteato-hepatites pós-RVS (não detectadas no presente estudo), efeitos adversos ainda desconhecidos de drogas ou até a presença de outros agentes causadores de hepatites crônicas ao longo da história desses pacientes.

## 6.2 O estudo imuno-histoquímico da citoqueratina 7 destacando a ativação das células progenitoras hepáticas (CPH)

Consideramos que o conhecimento sobre a ativação da CPH na hepatite C crônica, e suas possíveis modificações com o tratamento com DAAs, possa contribuir com informações sobre possíveis mecanismos de reparação e sua relação com os principais padrões de lesão hepática, destacando-se a atividade necroinflamatória de interface e a

necrose lítica focal. Até onde pudemos identificar na literatura, supomos que a presente tese seja pioneira no estudo da ativação de CPH através da imunorreação para CK7 no contexto da hepatite C crônica submetida a tratamento por DAAs.

Na lesão hepática, ocorre uma notável plasticidade nas células epiteliais do fígado, de modo que, em circunstâncias específicas, os hepatócitos adultos, vizinhos aos focos de lesões de interface e de perda de hepatócitos intralobulares e/ou as células do epitélio biliar (CEBs), parecem capazes de mediar a regeneração hepática. Há algumas evidências morfológicas que, em meio a esse processo, haja etapas intermediárias da ativação da célula progenitora [286]. As CPHs são células bipotentes capazes de originar hepatócitos ou células do epitélio biliar (CEBs) [287]; e a ativação e expansão dessas células progenitoras é um processo complexo que apresenta diferentes fenótipos, estando em geral associado à infiltração de células inflamatórias, ativação de miofibroblastos e deposição de matriz [138]. As apresentações da CPH podem diferir em morfologia, variando de células isoladas ou cadeias de células mais desorganizadas sem lúmen visível, até ductulos organizados com lúmen melhor identificável [269].

Em nosso presente estudo, os diferentes tipos morfológicos da CPH foram identificados como célula progenitora isolada (CPI), estrutura ductular isolada (EDI) e reação ductular (RD), como previamente descrito por Libbrecht et al. e com modificações [288]. A detecção das CPH em doenças hepáticas humanas é baseada na presença de células com aparência histológica típica, combinada a marcadores imuno-histoquímicos apropriados. Diversos marcadores imuno-histoquímicos foram descritos para identificar estas células, incluindo CK19, CK7, GST-p, MK-2 e AFP (Faris et al., 1991; Vandersteenhoven et al., 1990; Hsia et al., 1992). Portanto, o uso combinado da morfologia com a imuno-histoquímica para caracterizar a CPH pode trazer informações relevantes quanto à presença dessas células em diversas condições. A CK7 e a CK19 são geralmente reconhecidas como marcadores fenotípicos confiáveis para as CPHs [126, 133]. Entretanto, a detecção imuno-histoquímica do CK7 é considerada mais vantajosa para a identificação das células hepatobiliares intermediárias [289], tendo sido nossa opção de escolha. Demonstramos que a CK7 é um marcador confiável para detecção da CPH.

Em nosso estudo, as CPHs estiveram presentes, sendo identificadas no tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica através da imunorreatividade para o CK7, e frequentemente observadas em estreita associação a células inflamatórias. Nossos dados confirmam resultados prévios que demonstraram a expansão da CPH na hepatite crônica

ativa [132, 133]. Delladetsima et al. [135], em 2010, demonstraram, através da expressão da CK7, a presença da CPH em 49 das 50 biópsias de pacientes com hepatite C crônica, com exceção de um caso com hepatite mínima. Independente do grau e estágio da hepatite, a CPH ocorreu em um padrão combinado de RD na placa limitante, e CPI e EDI no parênquima [135]. Em nosso estudo, de forma similar, as diferentes formas de apresentação da CPH foram um achado constante nos casos examinados.

Demonstramos que a ativação da CPH ocorreu em todos os casos aqui estudados, sendo importante reconhecer que tal ativação ocorreu em menor quantidade nos explantes de pacientes tratados com DAAs. Tal redução da ativação da CPH se mostrou significativamente associada à redução de marcadores histológicos de inflamação, especialmente da atividade de interface. Vale ressaltar que o intuito de descrever “fases intermediárias” da ativação das CPHs foi muito bem-sucedido em nosso trabalho, conforme demonstram as figuras nas quais apresentamos as imagens de CPI, EDI e RD (**Figura 14**). A evolução da ativação da CPH foi nítida, inicialmente como células progenitoras isoladas (CPI), seguindo-se as estruturas ductulares isoladas (EDI) e a reação ductular (RD), sendo um importante resultado deste estudo a demonstração da associação desta ativação de CPHs com as demais evidências de lesões histológicas habitualmente usadas como indicadoras de atividade das hepatites crônicas.

Similarmente, Delladetsima et al. [135] avaliaram a presença da CPH na hepatite C crônica e relacionaram a parâmetros histológicos, clínicos e virológicos. Naquele estudo, o padrão de distribuição intraparenquimatoso da CPH se correlacionou com a atividade necroinflamatória lobular e com a fibrose em estágio inicial, e hepatócitos CK7+ foram observados quase exclusivamente em região periportal e na presença de hepatite de interface.

Respostas semelhantes às que aqui obtivemos nos pacientes com RVS induzida por DAAs foram reportados em pacientes cirróticos com HCV que atingiram RVS mediante tratamento com IFN [289, 290].

Estudos experimentais sugeriram uma tênue ligação entre a expansão da CPH e a resposta fibrogênica [291, 292] e acredita-se que a ativação da CPH esteja positivamente correlacionada com a rigidez hepática e a ativação das células estreladas hepáticas [293]. Na infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), o estágio avançado de fibrose foi associado a um maior número de células estreladas hepáticas ativadas e CPHs [294], havendo inclusive evidências de que as próprias CPHs possam secretar citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas [295].

Acredita-se que a ativação da CPH seja desencadeada por um comprometimento da capacidade regenerativa das células epiteliais diferenciadas do fígado durante a lesão hepática, e na lesão hepática crônica, foi demonstrado que o grau de ativação da CPH se correlaciona positivamente com a gravidade da doença [269, 296].

Supõe-se que no parênquima hepático normal, a substituição dos hepatócitos perdidos ocorra pela replicação de hepatócitos maduros vizinhos, na mesma trabécula hepática, e a inibição dessa replicação promova a ativação de uma via replicativa secundária através das CPHs. A infecção crônica pelo HCV causa a parada do ciclo celular, prejudicando a replicação dos hepatócitos maduros [297, 298]. Os mediadores potenciais dessa resposta incluem espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e as proteínas do HCV [289]. De fato, as citocinas produzidas pelas células inflamatórias podem atuar como fatores de crescimento, promovendo a proliferação da CPH [288]. Na infecção crônica pelo HCV, a ativação da CPH pode ser induzida pelos efeitos inibitórios do IFN-gama e do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que são citocinas inflamatórias superexpressas em fígados com hepatite C crônica [299, 300] durante a replicação dos hepatócitos maduros. A gama-glutamil transpeptidase (GGT) exerce um importante papel na defesa antioxidante, participando no metabolismo da glutathiona [301] e é regulado positivamente após a exposição ao estresse oxidativo [302]. O estresse oxidativo inibe a replicação de hepatócitos maduros, resultando na ativação das CPHs [303]. Além disso, o comprometimento do ciclo celular dos hepatócitos maduros mediado pela proteína do HCV provavelmente contribui para a ativação da CPH. Inclusive Kannan et al, em 2011, mostraram que o grau de interrupção do ciclo celular está associado à abundância de proteínas virais em células cultivadas infectadas com o HCV [298].

Assim, parece que a proliferação de CPH possa estar intimamente relacionada a citocinas produzidas por células inflamatórias ou células associadas ao desenvolvimento da fibrose (ou seja, células estreladas) [289]. Portanto, o aumento da ativação da CPH na hepatite C crônica, seguido pela menor ativação da CPH após terapia bem-sucedida com DAAs reforça a ideia da ação anti-inflamatória além do efeito antiviral destas medicações.

Destacamos que a erradicação da infecção pelo HCV com o tratamento com DAAs representa um fator preditivo para a normalização pós-tratamento da CPH, contribuindo para a reversão da ativação aumentada. Isso apoia o conceito de que a erradicação do vírus melhora a inflamação e pode melhorar o comprometimento relacionado ao HCV da replicação de hepatócitos maduros [289].

Em nosso estudo, as CPHs foram frequentemente encontradas no tecido hepático em íntima associação ao tecido fibroso, proliferando ao longo dos septos e da interface perisseptal que circundam os nódulos regenerativos. Todos nossos casos apresentavam alto grau de fibrose/cirrose, principalmente em estágio 4B, o que possivelmente impediu que demonstrássemos eventual relação entre regressão da fibrose e grau de ativação das CPHs. Estudos futuros deverão ser delineados visando a melhor avaliação da eventual relação entre as vias moleculares de ativação das CPHs e aquelas responsáveis pela ativação da deposição de colágeno, especialmente incluindo amostras hepáticas com hepatites C crônicas com alterações arquiteturais menos avançadas.

### 6.3 Imunologia

Os diferentes subtipos de células imunes desempenham importantes funções na patogênese, progressão e resultados do tratamento da infecção pelo HCV [150]. A maioria dos trabalhos envolvendo a população de células imunes são realizados com amostras de sangue periférico, nos quais a caracterização imunológica da linhagem dos grandes grupos mieloides e linfoides ocorre por citometria de fluxo [304, 305]. Ressaltamos em nosso estudo, a intenção essencial de análise dos linfócitos no tecido, permitindo observar magnitude, distribuição e compartimentalização destas células, além de analisar sua relação com os parâmetros histológicos.

A hepatite C crônica exerce profundo impacto sobre o sistema imune do hospedeiro. O microambiente hepático é extremamente complexo com diversas populações de células imunes que, associadas às citocinas que produzem, desempenham papel central no controle da infecção. Acredita-se que a interação entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro seja capaz de influenciar o resultado da infecção e que durante a infecção crônica, o recrutamento imune ao vírus esteja intensamente prejudicado [306].

A infecção crônica pelo HCV representa um prejuízo da imunidade adaptativa, com expressão de moléculas imunorreguladoras, e células T CD4+ e CD8+ disfuncionais, contribuindo assim para a inabilidade em curar a infecção [307, 308]. A falha das respostas específicas das células T CD8+ ocorre principalmente devido ao escape viral e exaustão celular, que caracterizam a infecção crônica [96, 308]. A falta do auxílio das células T CD4+, associado à ação de células T reguladoras (Tregs) ou citocinas como IL-10, e à expressão de receptores coinibitórios, como PD-1, possivelmente contribuem para o prejuízo imune [144].

Com o advento dos DAAs, a hepatite C crônica passou a representar um importante novo modelo de infecção crônica, no qual o patógeno pode ser eliminado com sucesso. No entanto, a capacidade de revigoração do sistema imunológico após a eliminação do patógeno permanece pouco compreendida.

Neste estudo, descrevemos alterações significativas nas frequências de células imunes intra-hepáticas como resultado do tratamento com DAAs e relatamos achados significativos relacionados a inflamação hepática. Demonstramos na região da interface perisseptal que as populações celulares B CD20+, T CD8+ e TD3+, ainda que persistentes, apresentaram significativa diminuição com o tratamento antiviral. As células T CD4+ também se mostraram em menor número nos pacientes tratados, mas tal achado não atingiu significância estatística. Além disso, demonstramos associação entre a expressão de linfócitos T CD3+ e as variáveis histológicas atividade de interface perisseptal, necrose lítica focal e balonização hepatocelular. Observamos que os menores graus de atividade de interface perisseptal e necrose lítica focal se relacionaram com a baixa expressão dos linfócitos T CD3+ e os maiores graus se relacionaram com a alta expressão ( $p = 0,028$  e  $p = 0,009$ , respectivamente); além disso, os únicos cinco pacientes com grau 1 de balonização hepatocelular apresentaram alta expressão de CD3+ ( $p = 0,033$ ).

A diminuição dos diferentes tipos de células inflamatórias avaliadas destacou que o tratamento antiviral com DAA, além de inibir a replicação viral, atua sobre a população celular imune e exerce um efeito anti-inflamatório, talvez contribuindo para uma possível recuperação das respostas imunes adaptativas exauridas. A notável diminuição observada na frequência das células inflamatórias em pacientes tratados com DAA parece ser biologicamente plausível, uma vez que, após a remoção do estímulo antigênico, é esperada a redução da inflamação, em especial dos linfócitos T CD8+ citotóxicos, como consequência da redução da inflamação sistêmica. Consideramos a possibilidade de que a menor infiltração das células imunes observada no compartimento hepático tratado possa estar diretamente relacionada ao desenvolvimento da resposta antiviral coordenada durante a terapia DAA e que possa mesmo contribuir para a eliminação do HCV [309].

Demonstramos aqui que, após o tratamento com DAAs, ocorre diminuição dos marcadores de inflamação hepática [310], e demonstramos que também ocorre a diminuição dos diferentes tipos de células imunes na região da interface perisseptal do tecido hepático. Nossos resultados estão em acordo com os dados de Orr et al. [276] que identificaram por imuno-histoquímica a frequência de células imunes intra-hepáticas, embora as regiões do parênquima analisadas terem diferido da nossa análise. Aqueles autores relataram diminuição

significativa de células T CD8+ e TCD4+ na região portal ao longo do tratamento com DAAs. Curiosamente, naquele estudo não ocorreu diferença significativa nas células T CD8+ pré e pós-tratamento entre pacientes respondedores RVS+ e relapsos. Isso foi considerado consistente com a noção de que o declínio observado na densidade das células T CD8+ representa uma resposta celular intra-hepática à redução da carga viral, mas não necessariamente à erradicação viral [276].

A infecção crônica pelo HCV tem sido associada a perturbações funcionais nas células imunes intra-hepáticas, e tem-se demonstrado que tais perturbações melhoram com os DAAs [311, 312]. Foi descrita uma recuperação parcial da funcionalidade e capacidade de proliferação das células T após o tratamento com DAA, que não se aplicou a todos os pacientes, e o nível de restauração não foi homogêneo para todos os indivíduos [313]. A supressão da replicação do HCV após o tratamento antiviral levou à diminuição na expressão dos marcadores de exaustão de linfócitos T e ao aumento nas respostas de IFN- $\gamma$  específicas. No entanto, a restauração do fenótipo esgotado dos linfócitos T CD8+ específicos do HCV não representou uma restauração funcional completa [314]. Debes et al. [315] avaliaram, na infecção pelo HCV, os níveis séricos de mediadores imunes após o tratamento com DAA, e identificaram que diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, assim como fatores de crescimento e marcadores de apoptose, atingem valores séricos normais com o tratamento antiviral, sugerindo que possa ocorrer uma modulação imune mediada por DAA. A “força da recuperação” da função imune inata e adaptativa no fígado e no sangue periférico com o tratamento antiviral foi relatada por Martin et al. [96] que avaliaram a restauração funcional das células T CD8+ específicas sob terapia livre de IFN, e destacaram a presença de células T CD8+ funcionalmente competentes pós-tratamento, podendo até conferir proteção contra a reinfeção. Outro estudo, investigando a resposta funcional das células T CD8+ específicas do HCV em pacientes recebendo terapias com DAA, sugeriu uma restauração parcial das funções efetoras, em particular da proliferação dessas células. Ainda assim, o nível de restauração foi heterogêneo [96]. Em estudo muito recente, Pisano e colaboradores [313] também ressaltaram a recuperação parcial da funcionalidade e capacidade de proliferação das células T após o tratamento com DAAs, sendo que o nível de restauração não foi homogêneo para todos os indivíduos. Shrivastava e colaboradores demonstraram que a supressão da replicação do HCV levou a um declínio na expressão do marcador de exaustão de células T, e a um aumento nas respostas de IFN- $\gamma$  específicas do HCV após o tratamento. No entanto, a restauração do fenótipo esgotado dos linfócitos T CD8+ específicos do HCV não representou uma restauração funcional completa [316]. Khan e colaboradores também demonstraram que a restauração do fenótipo de



superfície exaurido de células T CD8+ específicas do HCV não se traduziu em revigoramento funcional completo, e foi relatada a persistência da disfunção mitocondrial e metabólica destas células apesar da eliminação do patógeno [317].

Em relação às células T CD4+ específicas, o tratamento antiviral do HCV levou à mudança de uma célula T auxiliar 1 (Th1) para um ambiente de célula T auxiliar folicular (Tfh). Da mesma forma, os linfócitos T CD8+ específicos do HCV e as células Tfh provavelmente persistiram de maneira independente do antígeno [318]. Além disso, foi demonstrado na hepatite C crônica, que as células T reguladoras T CD4+CD25+ (Tregs) geralmente estão elevadas e exibem um fenótipo ativado no curso da infecção, que persiste mesmo após a terapia DAA [227]. Nosso resultado confirma o estudo de Bandera et al. [319], que, no contexto da coinfeção HCV/HIV, avaliaram a frequência de células T CD4+ e T CD8+ séricas, antes e após o tratamento antiviral com DAAs, sem RBV, e demonstraram que a erradicação da infecção não impactou na contagem de células T CD4+. Entretanto, outro estudo mais recente, realizado com número relativamente pequeno de pacientes com câncer e monoinfecção por HCV tratados com DAAs [320], demonstrou falta de associação entre a contagem ou porcentagem de células T CD4+ na RVS após o tratamento antiviral. Naquele estudo, os autores consideraram a segurança, eficácia e preditores de falha dos DAAs equivalentes a indivíduos sem câncer associado.

#### 6.4 Molécula PD-1 e fator de transcrição FOX-P3

Diversos mecanismos têm sido sugeridos como contributórios para a disfunção imune na hepatite C crônica, como a função prejudicada das células T auxiliares CD4+, e a exaustão das células T citotóxicas CD8+ com secreção suprimida de IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  [321]. A expressão aumentada de diferentes moléculas do checkpoint imune ou seus ligantes desempenham papel na não funcionalidade dos linfócitos, atuando impedindo a estimulação contínua de células T, e prevenindo respostas de células T descontroladas e o consequente dano tecidual imune mediado [322].

Durante a infecção crônica pelo HCV, as células T CD8+ específicas tornam-se progressivamente exauridas devido à estimulação antigênica constante e em nível aumentado [323]. A molécula de morte programada-1 (PD-1) é um dos mais reconhecidos dos receptores imune-inibitórios (checkpoint imune) da família CD28 de moléculas coestimulatórias, descrita como altamente expressa em células T exaustas e ativadas [324]. Supõe-se que a interação com seus ligantes PD-L1/PD-L2 seja capaz de inibir a proliferação das células T antígeno

específicas e a função efetora dessas células [324]. Também foi descrito que a supressão da proliferação, diferenciação e secreção de citocinas de linfócitos específicos do HCV, também é regulada pela regulação positiva de PD-1 nas células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs periféricas e intra-hepáticas [325]. Pacientes infectados cronicamente pelo HCV têm um número maior de células reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs quando comparados com indivíduos saudáveis, e o esgotamento dessas células aumenta a proliferação e as respostas específicas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> [170].

As células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs podem ser reconhecidas pela expressão do fator de transcrição *FOX-P3*. Essas células são fundamentais na manutenção da homeostase imunológica e no monitoramento de respostas imunes, e a citocina imunorreguladora, fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), é crucial para a ativação e manutenção dessas células [326]. Durante a infecção persistente pelo HCV, as células Tregs podem desempenhar um papel significativo na disfunção de células T específicas do HCV [237], e estudos sugerem que possam contribuir para o curso acelerado da doença hepática relacionada ao HCV [325].

Os dados de literatura então disponíveis nos levaram à hipótese de que o tratamento antiviral com DAAs, ao atuar como uma via de regulação negativa da expressão da proteína viral, possa induzir a diminuição da geração de células T reguladoras (Tregs) e reduzir a exaustão linfocitária, alterando a expressão de receptores do checkpoint imune. Isso repercutiria na restauração das respostas imunes adaptativas. Portanto, analisamos por imuno-histoquímica a expressão da molécula PD-1 e do fator de transcrição FOX-P3 em diferentes regiões do tecido hepático.

A regulação negativa foi demonstrada pela presença das células reguladoras T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs expressando FOX-P3<sup>+</sup>; e a demonstração de linfócitos expressando PD-1, mesmo sem a expressão de seus ligantes ser demonstrada, evidenciou a entrega de sinais negativos às células T, levando à exaustão ou apoptose [327]. Entretanto, nossos resultados não confirmaram modificações da expressão dessas moléculas com o tratamento antiviral.

No atual estudo, quer por questões biológicas ou de técnicas imuno-histoquímicas, observamos a presença de poucas células FOX-P3<sup>+</sup> e poucas células PD-1<sup>+</sup>, ambas predominantemente associadas à população linfoide que ocupa o septo portal. Células FOX-P3<sup>+</sup> e PD-1<sup>+</sup> foram também identificadas no interior dos lóbulos. Contudo, a presença de ambas foi muito escassa na região centrolobular. Assim, no presente estudo, a imunoexpressão do PD-1 e FOX-P3<sup>+</sup> não diferiu entre pacientes tratados e não tratados, e não demonstrou relação estatisticamente significativa com as variáveis histológicas.

Urbani e colaboradores [327] relataram a expressão persistente do PD-1 em amostras obtidas por biópsias de hepatite C crônica nas células T CD8+ específicas que permaneceram disfuncionais, e curiosamente demonstraram restauração funcional da capacidade de expansão destas células com o anticorpo (Ac) anti PD-L1. Wang e colaboradores [328] analisaram por imuno-histoquímica a expressão do PD-1 e seus ligantes em espécimes de biópsia de hepatite crônica. O padrão de expressão do PD-1 foi escasso no tecido e ocorreu no infiltrado linfocitário, não demonstrando relação com variáveis clínicas ou laboratoriais.

Ward et al. [237] identificaram as células T reguladoras FOX-P3+ no parênquima hepático de indivíduos com infecção crônica pelo HCV+ e buscaram desvendar o papel dessas células na progressão da doença. Células FOX-P3+ estavam presentes no portal infiltrado e foi demonstrado que as células FOX-P3+ constituem uma proporção inesperadamente alta do infiltrado celular na infecção persistente pelo HCV, não diferindo entre os estágios de fibrose. Com isso, concluíram que as células FOX-P3+ desempenham um papel crítico na regulação imune intra-hepática [237].

Algumas limitações da abordagem adotada em nosso estudo merecem discussão. Apesar de partirmos de um universo de casos relativamente grande, os critérios de inclusão e exclusão implicaram em redução do número de pacientes. Adicionalmente, reconhecemos a grande dificuldade na padronização dos marcadores PD-1 e FOX-P3 no tecido que analisamos e na identificação de linfócitos reativos para esses marcadores na interface perisseptal. Essa dificuldade impediu a realização de dupla coloração imuno-histoquímica que permitisse a análise simultânea dos diferentes tipos celulares delineando os subconjuntos de células T. Não foi possível avaliar as alterações nas células imunes periféricas específicas do HCV devido à natureza retrospectiva e à indisponibilidade de amostras de sangue passíveis de extração celular e análise funcional, não permitindo, por exemplo, a correlação com achados que demonstrem a restauração das células T específicas periféricas durante a terapia [96]. Finalmente, embora nosso desenho do estudo tenha sido aleatório com relação às áreas de escolha do tecido para demarcação, ficamos vulneráveis tanto a artefatos técnicos da lâmina, e diferenças sutis de coloração da amostra, quanto à composição parenquimatosa versus não parenquimatosa.

O recente surgimento de técnicas sofisticadas que identificam simultaneamente múltiplos antígenos em cortes teciduais permite a análise de relação espacial dos diversos tipos celulares no próprio território acometido pela doença [329-331]. A aplicação dessas técnicas ao estudo das hepatites crônicas permitirá o delineamento de trabalhos futuros que melhor esclareçam o estado de ativação ou exaustão de linfócitos presentes em cada tipo de lesão histológica.

## 7 CONCLUSÕES

1. As alterações inflamatórias nos pacientes tratados com DAAs mostraram-se significativamente menores que as observadas no grupo de pacientes não tratados. Ressalta-se entretanto que tais evidências histopatológicas de inflamação crônica persistiram em graus variados mesmo nos explantes dos pacientes tratados com DAAs com carga viral indetectável.
2. As alterações inflamatórias nos explantes de pacientes cirróticos tratados com DAAs e com carga viral indetectável apresentaram tendência à redução naqueles com maior tempo decorrido entre a eliminação do vírus e a realização do transplante, inclusive nos casos com mais de 12 meses após o tratamento. Em conjunto, tais achados podem corroborar a hipótese de que outros fatores possam despertar resposta imune a neo-antígenos de hepatócitos nos pacientes tratados com DAA.
3. A pesquisa imuno-histoquímica de citoqueratina 7 desvendou diversas peculiaridades das lesões histológicas em hepatites crônicas, permitindo a identificação e a semiquantificação das diferentes apresentações morfológicas que expressam a ativação da CPH, como CPI, EDI e RD.
4. A ativação da CPH foi detectada tanto em pacientes tratados quanto não tratados, mas apresentou-se significativamente menor nos explantes de pacientes tratados.
5. O estudo imuno-histoquímico permitiu a quantificação de linfócitos CD20+, CD3+, CD4+ e CD8+, demonstrando sua presença nos explantes de todos os pacientes tratados e não tratados. Todos esses marcadores, com exceção do CD4+, apresentaram-se em número significativamente maior de linfócitos nos explantes do grupo de pacientes não tratados, com persistência da infecção ativa.

## REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO). WHO publishes updated guidance on hepatitis C infection – with new recommendations on treatment of adolescents and children, simplified service delivery and diagnostics. [Internet] 2022 [citado 10 jan. 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/24-06-2022-WHO-publishes-updated-guidance-on-hepatitis-C-infection>
2. Muir AJ, et al. Daclatasvir in combination with asunaprevir and beclabuvir for hepatitis C virus genotype 1 infection with compensated cirrhosis. *JAMA*. 2015;313(17):1736-44. doi: 10.1001/jama.2015.3868.
3. Backus LI, et al. Impact of Sustained Virologic Response with Direct-Acting Antiviral Treatment on Mortality in Patients with Advanced Liver Disease. *Hepatology*. 2019;69(2):487-497. doi: 10.1002/hep.29408.
4. Whitcomb E, et al. Biopsy Specimens From Allograft Liver Contain Histologic Features of Hepatitis C Virus Infection After Virus Eradication. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(8):1279-1285. doi: 10.1016/j.cgh.2017.04.041.
5. Putra J, Schiano TD, Fiel MI. Histological assessment of the liver explant in transplanted hepatitis C virus patients achieving sustained virological response with direct-acting antiviral agents. *Histopathology*. 2018;72(6):990-996. doi: 10.1111/his.13453.
6. Celli R, et al. Liver Pathologic Changes After Direct-Acting Antiviral Agent Therapy and Sustained Virologic Response in the Setting of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2021;145(4):419-427. doi: 10.5858/arpa.2020-0008-OA.
7. Kim WR, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: liver. *Am J Transplant*. 2014 Jan;14 Suppl 1:69-96. doi: 10.1111/ajt.12581.
8. Forman LM, et al. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology*. 2002 Apr;122(4):889-96. doi: 10.1053/gast.2002.32418.
9. Foster GR, et al. Impact of direct acting antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2016;64(6):1224-31. doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.029.
10. Charlton M, et al. Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(3):649-59. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.010.
11. Belli LS, et al. ELITA consensus statements on the use of DAAs in liver transplant candidates and recipients. *J Hepatol*. 2017;67(3):585-602. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.006.
12. Belli LS, et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study. *J Hepatol*. 2016;65(3):524-31. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.010.
13. Roskams TA, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004;39(6):1739-45. doi: 10.1002/hep.20130.
14. Boulter L, Lu WY, Forbes SJ. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J Clin Invest*. 2013;123(5):1867-73. doi: 10.1172/JCI66026.
15. Sakellariou S, et al. Keratin 7 expression in hepatic cholestatic diseases. *Virchows Arch*. 2021;479(4):815-824. doi: 10.1007/s00428-021-03152-z.
16. Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(6):389-96. doi: 10.1016/s1084952102001258.

17. Michalopoulos GK, Khan Z. Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(4):876-882. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.004.
18. Craig CE, et al. The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis. *Semin Liver Dis*. 2004;24(1):49-64. doi: 10.1055/s-2004-823101.
19. Hartling HJ, et al. Immune regulation in chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(11):1387-97. doi: 10.3109/00365521.2016.1170875.
20. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*. 2013;14(10):996-1006. doi: 10.1038/ni.2691.
21. Ghosh A, et al. Lymphocyte Landscape after Chronic *Hepatitis C Virus* (HCV) Cure: The New Normal. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7473. doi: 10.3390/ijms21207473.
22. Manns MP, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17006. doi: 10.1038/nrdp.2017.6.
23. World Health Organization (WHO). Hepatitis C factsheet. [Internet] Genebra, Suíça; 2022. [citado 14 dez. 2022]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
24. Bang BR, Elmasry S, Saito T. Organ system view of the hepatic innate immunity in HCV infection. *J Med Virol*. 2016;88(12):2025-2037. doi: 10.1002/jmv.24569.
25. Holz L, Rehermann B. T cell responses in hepatitis C virus infection: historical overview and goals for future research. *Antiviral Res*. 2015;114:96-105. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.11.009.
26. Rehermann B. Natural Killer Cells in Viral Hepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(6):578-588. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.09.004.
27. Yoon JC, et al. Natural killer cells in hepatitis C: Current progress. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1449-60. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1449.
28. Pol S, Lagaye S. The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes Immun*. 2019;20(5):436-446. doi: 10.1038/s41435-019-0066-z.
29. Kozbial K, et al. Follow-up of sustained virological responders with hepatitis C and advanced liver disease after interferon/ribavirin-free treatment. *Liver Int*. 2018;38(6):1028-1035. doi: 10.1111/liv.13629.
30. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S58-68. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.012.
31. Hutin YJ, Bulterys M, Hirschall GO. How far are we from viral hepatitis elimination service coverage targets? *J Int AIDS Soc*. 2018;21 Suppl 2(Suppl Suppl 2):e25050. doi: 10.1002/jia2.25050.
32. Martinez MA, Franco S. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity. *Viruses*. 2020;13(1):41. doi: 10.3390/v13010041.
33. Rosen HR. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2429-38. doi: 10.1056/NEJMc1006613.
34. AASLD-IDS. HCV guidance: recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. [Internet] Danvers, Massachusetts: 2020. [citado 14 dez. 2022]. Disponível em: <http://hcvguidelines.org/>
35. World Health Organization (WHO). Global Hepatitis Report 2017. Genebra, Suíça: World Health Organization; 2017. ISBN: 978-92-4-156545-5.
36. Beraldo N. Brasil avança no combate à hepatite C. [Internet] Distrito Federal, Brasil: 2020. [citado 15 dez. 2022] Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/outubro/brasil-avanca-no-combate-a-hepatite-c>.

37. Alter HJ, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann. Intern. Med.* 1972;77:691–699. doi: 10.7326/0003-4819-77-5-691.
38. Prince AM, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet.* 1974;2:241–246. doi: 10.1016/S0140-6736(74)91412-3.
39. Alter HJ, et al. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet.* 1975;2:838–841. doi: 10.1016/S0140-6736(75)90234-2.
40. Feinstone SM, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* 1975;292:767–770. doi: 10.1056/NEJM197504102921502.
41. Alter HJ, et al. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet.* 1978;1:459–463. doi: 10.1016/S0140-6736(78)90131-9.
42. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 2009;51(5):939–48. doi: 10.1016/j.jhep.2009.08.004.
43. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005;436(7053):933–8. doi: 10.1038/nature04077. PMID: 16107832.
44. Luna JM, Saeed M, Rice CM. Taming a beast: lessons from the domestication of hepatitis C virus. *Curr Opin Virol.* 2019;35:27–34. doi: 10.1016/j.coviro.2019.02.008.
45. Rabaan AA, et al. Overview of hepatitis C infection, molecular biology, and new treatment. *J Infect Public Health.* 2020;13(5):773–783. doi: 10.1016/j.jiph.2019.11.015.
46. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S3–S13. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.
47. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(6):453–63. doi: 10.1038/nrmicro1645.
48. Ashfaq UA, et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J.* 2011;8:161. doi: 10.1186/1743-422X-8-161.
49. Tzarum N, Wilson IA, Law M. The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Front Immunol.* 2018;9:1315. doi: 10.3389/fimmu.2018.01315.
50. Steinmann E, et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e103. doi: 10.1371/journal.ppat.0030103.
51. Khromykh AA, Westaway EG. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol.* 1997;71(2):1497–505. doi: 10.1128/JVI.71.2.1497-1505.1997.
52. Pietschmann T, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(19):7408–13. doi: 10.1073/pnas.0504877103.
53. Kim JL, et al. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell.* 1996;87(2):343–55. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81351-3. Erratum in: *Cell* 1997;89(1):159.
54. Asabe SI, et al. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol.* 1997;71(1):790–6. doi: 10.1128/JVI.71.1.790-796.1997.

55. Gale MJ Jr, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*. 1997;230(2):217-27. doi: 10.1006/viro.1997.8493.
56. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science*. 1999;285(5424):26-30. doi: 10.1126/science.285.5424.26.
57. Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(3):161-176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9.
58. Gower E, et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S45-57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.
59. Lombardi A, Mondelli MU; ESCMID Study Group for Viral Hepatitis (ESGVH). Hepatitis C: Is eradication possible? *Liver Int*. 2019;39(3):416-426. doi: 10.1111/liv.14011.
60. Platt L, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(7):797-808. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00485-5.
61. Spearman CW, et al. Hepatitis C. *Lancet*. 2019;394(10207):1451-1466. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32320-7.
62. Brasil. Ministério da Saúde. Hepatite C. [Internet] Brasília, Brasil, 2022. [citado em 15 dez. 2022] Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/hepatites-virais/hepatite-c>.
63. Nutini MFR, et al. HCV genotype profile in Brazil of mono-infected and HIV co-infected individuals: A survey representative of an entire country. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227082. doi: 10.1371/journal.pone.0227082.
64. Messina JP, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77-87. doi: 10.1002/hep.27259.
65. Borgia SM, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 2018;218(11):1722-1729. doi: 10.1093/infdis/jiy401.
66. Hytiroglou P, Theise ND. Regression of human cirrhosis: an update, 18 years after the pioneering article by Wanless et al. *Virchows Arch*. 2018;473(1):15-22. doi: 10.1007/s00428-018-2340-2.
67. Swain MG, et al. A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1593-601. doi: 10.1053/j.gastro.2010.07.009.
68. Manns MP, et al. Long-term clearance of hepatitis C virus following interferon  $\alpha$ -2b or peginterferon  $\alpha$ -2b, alone or in combination with ribavirin. *J Viral Hepat*. 2013;20(8):524-9. doi: 10.1111/jvh.12074.
69. AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 2015;62(3):932-54. doi: 10.1002/hep.27950.
70. Morgan RL, et al. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med*. 2013;158(5 Pt 1):329-37. doi: 10.7326/0003-4819-158-5-201303050-00005.
71. van der Meer AJ, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA*. 2012;308(24):2584-93. doi: 10.1001/jama.2012.144878.



72. Flemming JA, et al. Reduction in liver transplant wait-listing in the era of direct-acting antiviral therapy. *Hepatology*. 2017;65(3):804-812. doi: 10.1002/hep.28923.
73. Poordad F, et al. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N Engl J Med*. 2014;370(21):1973-82. doi: 10.1056/NEJMoa1402869.
74. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da Transmissão Vertical do HIV, Sífilis e Hepatites Virais [Internet] Brasília, Brasil, 2022. [acesso em 18 dez. 2022] Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo\\_clinico\\_hiv\\_sifilis\\_hepatites.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_hiv_sifilis_hepatites.pdf) ISBN 978-65-5993-234-4
75. Younossi Z, Henry L. The impact of the new antiviral regimens on patient reported outcomes and health economics of patients with chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis*. 2014;46 Suppl 5:S186-96. doi: 10.1016/j.dld.2014.09.025.
76. Smith-Palmer J, Cerri K, Valentine W. Achieving sustained virologic response in hepatitis C: a systematic review of the clinical, economic and quality of life benefits. *BMC Infect Dis*. 2015;15:19. doi: 10.1186/s12879-015-0748-8.
77. Poynard T, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1303-13. doi: 10.1053/gast.2002.33023.
78. González-Grande R, et al. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1421-32. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1421.
79. Hézode C, et al. Effectiveness of telaprevir or boceprevir in treatment-experienced patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis. *Gastroenterology*. 2014;147(1):132-142.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2014.03.051.
80. Liang TJ, Ghany MG. Current and future therapies for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2013;368(20):1907-17. doi: 10.1056/NEJMr1213651.
81. Backus LI, et al. Impact of Sustained Virologic Response with Direct-Acting Antiviral Treatment on Mortality in Patients with Advanced Liver Disease. *Hepatology*. 2019;69(2):487-497. doi: 10.1002/hep.29408.
82. Carrat F, et al. Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: a prospective cohort study. *Lancet*. 2019;393(10179):1453-1464. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32111-1.
83. Butt AA, et al. Effect of Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir/Dasabuvir and Ledipasvir/Sofosbuvir Regimens on Survival Compared With Untreated Hepatitis C Virus-Infected Persons: Results From ERCHIVES. *Clin Infect Dis*. 2017;65(6):1006-1011. doi: 10.1093/cid/cix364.
84. European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series. *J Hepatol*. 2020;73(5):1170-1218. doi: 10.1016/j.jhep.2020.08.018. Erratum in: *J Hepatol*. 2023;78(2):452.
85. Deore RR, Chern JW. NS5B RNA dependent RNA polymerase inhibitors: the promising approach to treat hepatitis C virus infections. *Curr Med Chem*. 2010;17(32):3806-26. doi: 10.2174/092986710793205471.
86. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Chronic hepatitis C virus infection: developing direct-acting antiviral drugs for treatment guidance for industry. [Internet] Rockville, Estados Unidos da America, 2017. [citado em 18 dez. 2022] Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda>

- guidance-documents/chronic-hepatitis-c-virus-infection-developing-direct-acting-antiviral-drugs-treatment-guidance
87. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the clinical evaluation of direct acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis. [Internet] Londres, Reino Unido, 2016. [citado em 18 dez. 2022] Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/07/WC500209917.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/07/WC500209917.pdf)
  88. Ferrarese A, et al. Hepatitis C virus related cirrhosis decreased as indication to liver transplantation since the introduction of direct-acting antivirals: A single-center study. *World J Gastroenterol.* 2018;24(38):4403-4411. doi: 10.3748/wjg.v24.i38.4403
  89. Sáez-González E, et al. Impact of hepatitis C virus (HCV) antiviral treatment on the need for liver transplantation (LT). *Liver Int.* 2018;38(6):1022-1027. doi: 10.1111/liv.13618.
  90. Belli LS, et al. Impact of DAAs on liver transplantation: Major effects on the evolution of indications and results. An ELITA study based on the ELTR registry. *J Hepatol.* 2018;69(4):810-817. doi: 10.1016/j.jhep.2018.06.010.
  91. Rossi C, et al. Hepatitis C virus reinfection after successful treatment with direct-acting antiviral therapy in a large population-based cohort. *J Hepatol.* 2018;69(5):1007-1014. doi: 10.1016/j.jhep.2018.07.025.
  92. Sagnelli E, et al. Resistance detection and re-treatment options in hepatitis C virus-related chronic liver diseases after DAA-treatment failure. *Infection.* 2018;46(6):761-783. doi: 10.1007/s15010-018-1188-3.
  93. Zuckerman A, Chastain CA, Naggie S. Retreatment Options Following HCV Direct Acting Antiviral Failure. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2017;9(4):389-402. doi: 10.1007/s40506-017-0136-6.
  94. Kozbial K, et al. Follow-up of sustained virological responders with hepatitis C and advanced liver disease after interferon/ribavirin-free treatment. *Liver Int.* 2018;38(6):1028-1035. doi: 10.1111/liv.13629.
  95. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:87-112. doi: 10.1007/978-3-642-27340-7\_4.
  96. Martin B, et al. Restoration of HCV-specific CD8+ T cell function by interferon-free therapy. *J Hepatol.* 2014;61(3):538-43. doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.043.
  97. Knodell RG, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00005-9.
  98. Ishak K, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22(6):696-9. doi: 10.1016/0168-8278(95)80226-6.
  99. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol.* 1991;13(3):372-4. doi: 10.1016/0168-8278(91)90084-o.
  100. IASL Cancun Meeting. May 19-23, 1994. Abstracts. *Hepatology.* 1994 Apr;19(4):38I-152I. PMID: 8138249.
  101. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol.* 1995;19(12):1409-17. doi: 10.1097/00000478-199512000-00007.
  102. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1996;24(2):289-93. doi: 10.1002/hep.510240201.

103. Dhingra S, Ward SC, Thung SN. Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(4):1357-66. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1357.
104. Popper H, Schaffner F. The vocabulary of chronic hepatitis. *N Engl J Med.* 1971;284(20):1154-6. doi: 10.1056/NEJM197105202842011.
105. Ishak KG. Chronic hepatitis: morphology and nomenclature. *Mod Pathol.* 1994;7(6):690-713. PMID: 7991529.
106. Ludwig J. The nomenclature of chronic active hepatitis: an obituary. *Gastroenterology.* 1993;105(1):274-8. doi: 10.1016/0016-5085(93)90037-d.
107. Scheuer PJ. The nomenclature of chronic hepatitis: time for a change. *J Hepatol.* 1995;22(1):112-4. doi: 10.1016/0168-8278(95)80269-x.
108. Kim SU, et al. The Laennec staging system for histological sub-classification of cirrhosis is useful for stratification of prognosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2012 Sep;57(3):556-63. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.029. Epub 2012 May 19. PMID: 22617153.
109. Alves VAF, Gayotto LCC. *Patologia das Hepatites.* In: Silva, L. C. *Hepatites agudas e crônicas.* São Paulo: Sarvier; 1995
110. Kattakuzhy S, Levy R, Kottiril S. Sofosbuvir for treatment of chronic hepatitis C. *Hepatol Int.* 2015;9(2):161-73. doi: 10.1007/s12072-014-9606-9.
111. Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. *J Gastroenterol.* 2007;42(7):513-21. doi: 10.1007/s00535-007-2064-6.
112. Guido M, et al. Chronic viral hepatitis: the histology report. *Dig Liver Dis.* 2011;43 Suppl 4:S331-43. doi: 10.1016/S1590-8658(11)60589-6.
113. Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Am J Clin Pathol.* 2000;113(1):40-55. doi: 10.1309/42D6-W7PL-FX0A-LBXF.
114. Popper H. Changing concepts of the evolution of chronic hepatitis and the role of piecemeal necrosis. *Hepatology.* 1983;3(5):758-62. doi: 10.1002/hep.1840030522.
115. Baptista A, et al. The diagnostic significance of periportal hepatic necrosis and inflammation. *Histopathology.* 1988;12(6):569-79. doi: 10.1111/j.1365-2559.1988.tb01982.x.
116. Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology.* 1992;15(4):572-7. doi: 10.1002/hep.1840150403.
117. Scheuer PJ, et al. The pathology of hepatitis C. *Hepatology.* 1992;15(4):567-71. doi: 10.1002/hep.1840150402.
118. Poulsen H, Christoffersen P. Abnormal bile duct epithelium in liver biopsies with histological signs of viral hepatitis. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1969;76(3):383-90. doi: 10.1111/j.1699-0463.1969.tb03269.x.
119. Mihm S, et al. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology.* 1997;25(3):735-9. doi: 10.1002/hep.510250340.
120. MacSween RNM, et al. *MacSween's Pathology of the Liver*, 6th ed.; Burt, A.D., Portmann, B., Ferrell, L.D., Eds.; Churchill Livingstone Elsevier: Edingburgh, NY, USA, 2012.
121. Bedossa P. Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy: who and why? *Liver Int.* 2015;35 Suppl 1:78-81. doi: 10.1111/liv.12710.
122. Shiratori Y, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med.* 2000;132(7):517-24. doi: 10.7326/0003-4819-132-7-200004040-00002.

123. Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(11):1599-607. doi: 10.5858/2000-124-1599-ROHC.
124. Lefkowitz JH, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology.* 1993;104(2):595-603. doi: 10.1016/0016-5085(93)90432-c.
125. Farinati F, et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22(4):449-56. doi: 10.1016/0168-8278(95)80108-1.
126. Bateman AC, Hübscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology.* 2010;56(4):415-25. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03391.x.
127. Sakellariou S, et al. Keratin 7 expression in hepatic cholestatic diseases. *Virchows Arch.* 2021;479(4):815-824. doi: 10.1007/s00428-021-03152-z.
128. Hering E. Über den bau der Wirbelthierleber. *Arch. F. Mikr. Anat.* 1967;3:88–114.
129. Theise ND, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology.* 1999;30(6):1425-33. doi: 10.1002/hep.510300614.
130. Rubio CA. The detection of bile ducts in liver biopsies by cytokeratin 7. *In Vivo.* 1998;12(2):183-6. PMID: 9627800.
131. Yabushita K, et al. Aberrant expression of cytokeratin 7 as a histological marker of progression in primary biliary cirrhosis. *Liver.* 2001;21(1):50-5. doi: 10.1034/j.1600-0676.2001.210108.x.
132. Tan J, et al. Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases. *Liver.* 2002;22(5):365-73. doi: 10.1034/j.1600-0676.2002.01622.x.
133. Eleazar JA, et al. Progenitor cell expansion: an important source of hepatocyte regeneration in chronic hepatitis. *J Hepatol.* 2004;41(6):983-91. doi: 10.1016/j.jhep.2004.08.017.
134. Chen J, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver Int.* 2017;37(9):1260-1271. doi: 10.1111/liv.13377.
135. Delladetsima J, et al. Hepatic progenitor cells in chronic hepatitis C: a phenomenon of older age and advanced liver disease. *Virchows Arch.* 2010;457(4):457-66. doi: 10.1007/s00428-010-0957-x.
136. Clouston AD, et al. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology.* 2005;41(4):809-18. doi: 10.1002/hep.20650.
137. Theise ND, Kuwahara R. The tissue biology of ductular reactions in human chronic liver disease. *Gastroenterology.* 2007;133(1):350-2. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.040.
138. Sato K, et al. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology.* 2019;69(1):420-430. doi: 10.1002/hep.30150.
139. Dewidar B, et al. TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells.* 2019;8(11):1419. doi: 10.3390/cells8111419.
140. Zhou H, et al. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology.* 2007;45(3):716-24. doi: 10.1002/hep.21557.
141. Kuwahara R, et al. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology.* 2008;47(6):1994-2002. doi: 10.1002/hep.22218.

142. Goldstein NS, Soman A, Gordon SC. Portal tract eosinophils and hepatocyte cytokeratin 7 immunoreactivity helps distinguish early-stage, mildly active primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Am J Clin Pathol.* 2001;116(6):846-53. doi: 10.1309/VHHD-HTRU-N8J2-5X7R.
143. Rygiel KA, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest.* 2008;88(2):112-23. doi: 10.1038/labinvest.3700704.
144. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S14-25. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.035.
145. Spaan M, Janssen HL, Boonstra A. Immunology of hepatitis C virus infections. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26(4):391-400. doi: 10.1016/j.bpg.2012.09.005.
146. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(8):509-23. doi: 10.1038/nri.2016.69.
147. Kell A, et al. Pathogen-Associated Molecular Pattern Recognition of Hepatitis C Virus Transmitted/Founder Variants by RIG-I Is Dependent on U-Core Length. *J Virol.* 2015;89(21):11056-68. doi: 10.1128/JVI.01964-15.
148. Thimme R, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15661-8. doi: 10.1073/pnas.202608299.
149. Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature.* 2005;436(7053):939-45. doi: 10.1038/nature04078.
150. Chigbu DI, et al. Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells.* 2019;8(4):376. doi: 10.3390/cells8040376.
151. Stuart JD, Salinas E, Grakoui A. Immune system control of hepatitis C virus infection. *Curr Opin Virol.* 2021;46:36-44. doi: 10.1016/j.coviro.2020.10.002.
152. Kemming J, Thimme R, Neumann-Haefelin C. Adaptive Immune Response against Hepatitis C Virus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5644. doi: 10.3390/ijms21165644.
153. Pelletier S, et al. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J Hepatol.* 2010;53(5):805-16. doi: 10.1016/j.jhep.2010.05.013.
154. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:457-495. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055318.
155. Baskic D, et al. Chronic Hepatitis C: Conspectus of immunological events in the course of fibrosis evolution. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219508. doi: 10.1371/journal.pone.0219508.
156. Osburn WO, et al. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology.* 2010;138(1):315-24. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.017.
157. Schulze Zur Wiesch J, et al. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med.* 2012;209(1):61-75. doi: 10.1084/jem.20100388.
158. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S54-62. doi: 10.1002/hep.21060.

159. Chen DY, et al. Hepatitis C virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell phenotype and function in different infection outcomes. *J Clin Invest.* 2020;130(2):768-773. doi: 10.1172/JCI126277.
160. Lucas M, et al. Tracking virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells during and after acute hepatitis C virus infection. *PLoS One.* 2007;2(7):e649. doi: 10.1371/journal.pone.0000649.
161. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-99. doi: 10.1038/nri3862.
162. Grakoui A, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 2003;302(5645):659-62. doi: 10.1126/science.1088774.
163. Shoukry NH, et al. Memory CD8<sup>+</sup> T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2003;197(12):1645-55. doi: 10.1084/jem.20030239.
164. Wu Z, et al. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int.* 2010;30(6):782-94. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02262.x.
165. Lechner F, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000;191(9):1499-512. doi: 10.1084/jem.191.9.1499.
166. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(4):227-42. doi: 10.1038/nri3405.
167. Cooper S, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity.* 1999;10(4):439-49. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80044-8.
168. Choudhuri K, et al. Immunology: how do T cells recognize antigen? *Curr Biol.* 2005;15(10):R382-5. doi: 10.1016/j.cub.2005.05.001.
169. Sen DR, et al. The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science.* 2016;354(6316):1165-1169. doi: 10.1126/science.aae0491.
170. Boettler T, et al. T cells with a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2005;79(12):7860-7. doi: 10.1128/JVI.79.12.7860-7867.2005.
171. Neumann-Haefelin C, et al. Virological and immunological determinants of intrahepatic virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell failure in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2008;47(6):1824-36. doi: 10.1002/hep.22242.
172. Erickson AL, et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 2001;15(6):883-95. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00245-x.
173. Luxenburger H, et al. HCV-Specific T Cell Responses During and After Chronic HCV Infection. *Viruses.* 2018;10(11):645. doi: 10.3390/v10110645.
174. Timm J, et al. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med.* 2004;200(12):1593-604. doi: 10.1084/jem.20041006.
175. Kasprovicz V, et al. Hepatitis C virus (HCV) sequence variation induces an HCV-specific T-cell phenotype analogous to spontaneous resolution. *J Virol.* 2010;84(3):1656-63. doi: 10.1128/JVI.01499-09.
176. Wherry EJ, et al. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.* 2007;27(4):670-84. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.006.
177. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9. doi: 10.1038/ni.2035.
178. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014;35(2):51-60. doi: 10.1016/j.it.2013.10.001.

179. Zajac AJ, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* 1998;188(12):2205-13. doi: 10.1084/jem.188.12.2205.
180. Gallimore A, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med.* 1998;187(9):1383-93. doi: 10.1084/jem.187.9.1383.
181. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 2015;36(4):265-76. doi: 10.1016/j.it.2015.02.008.
182. Larrubia JR, et al. Hepatitis C virus-specific cytotoxic T cell response restoration after treatment-induced hepatitis C virus control. *World J Gastroenterol.* 2015;21(12):3480-91. doi: 10.3748/wjg.v21.i12.3480.
183. Nakamoto N, et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology.* 2008;134(7):1927-37, 1937.e1-2. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.033.
184. Moskophidis D, et al. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* 1993;362(6422):758-61. doi: 10.1038/362758a0.
185. Wherry EJ, et al. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol.* 2003;77(8):4911-27. doi: 10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003.
186. Moreno-Cubero E, Larrubia JR. Specific CD8(+) T cell response immunotherapy for hepatocellular carcinoma and viral hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(28):6469-83. doi: 10.3748/wjg.v22.i28.6469.
187. Flecken T, et al. Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8+ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2014;59(4):1415-26. doi: 10.1002/hep.26731.
188. He XS, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5692-7. doi: 10.1073/pnas.96.10.5692.
189. Grabowska AM, et al. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol.* 2001;31(8):2388-94. doi: 10.1002/1521-4141(200108)31:8<2388::aid-immu2388>3.0.co;2-l.
190. Nakamoto N, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000313. doi: 10.1371/journal.ppat.1000313.
191. Wieland D, et al. TCF1+ hepatitis C virus-specific CD8+ T cells are maintained after cessation of chronic antigen stimulation. *Nat Commun.* 2017;8:15050. doi: 10.1038/ncomms15050.
192. Zhang S, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384(4):405-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.134.
193. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol.* 1994;68(12):8056-63. doi: 10.1128/JVI.68.12.8056-8063.
194. Veiga-Parga T, Sehrawat S, Rouse BT. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol Rev.* 2013;255(1):182-96. doi: 10.1111/imr.12085.

195. Utzschneider DT, et al. T Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity*. 2016;45(2):415-27. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.021.
196. Kamphorst AO, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(19):4993-4998. doi: 10.1073/pnas.1705327114.
197. Gardiner D, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One*. 2013;8(5):e63818. doi: 10.1371/journal.pone.0063818.
198. Fuller MJ, et al. Immunotherapy of chronic hepatitis C virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (PD-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):15001-6. doi: 10.1073/pnas.1312772110.
199. Paley MA, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science*. 2012;338(6111):1220-5. doi: 10.1126/science.1229620.
200. Kurktschiev PD, et al. Dysfunctional CD8+ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction. *J Exp Med*. 2014;211(10):2047-59. doi: 10.1084/jem.20131333.
201. Yao C, et al. Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8+ T cell persistence in chronic infection. *Nat Immunol*. 2019;20(7):890-901. doi: 10.1038/s41590-019-0403-4.
202. Alfei F, et al. TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection. *Nature*. 2019;571(7764):265-269. doi: 10.1038/s41586-019-1326-9.
203. Soldevila B, et al. A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations, CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4(+) CD25(+) CD127(low/-) FoxP3(+) T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. *J Viral Hepat*. 2011;18(6):384-92. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01317.x.
204. Essa S, et al. Modulation of Immune Cell Subsets by Hepatitis C Virus and Antiviral Therapy in Early Virological Response HCV Genotype 4-Infected Patients with Compensated Liver Disease. *Med Princ Pract*. 2021;30(2):168-177. doi: 10.1159/000511783.
205. Amati L, et al. The immune responsiveness in hepatitis C virus infected patients: effects of interferon-alfa/ribavirin combined treatment on the lymphocyte response with special reference to B cells. *Curr Pharm Des*. 2004;10(17):2093-100. doi: 10.2174/1381612043384231.
206. Claassen MA, et al. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J Hepatol*. 2010;52(3):315-21. doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.013.
207. Larrubia JR, et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3418-30. doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3418.
208. Barjon C, et al. Role of regulatory T-cells during hepatitis C infection: From the acute phase to post-transplantation recurrence. *Dig Liver Dis*. 2015;47(11):913-7. doi: 10.1016/j.dld.2015.06.014.
209. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:733-58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075043.



210. Ogonek J, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507.
211. Lopes JE, et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol.* 2006;177(5):3133-42. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3133.
212. Lam EW, et al. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(7):482-95. doi: 10.1038/nrc3539.
213. Sakaguchi S, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
214. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490.
215. Bennett CL, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-1. doi: 10.1038/83713.
216. Sakaguchi S, et al. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500. doi: 10.1038/nri2785.
217. Fontenot JD, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22(3):329-41. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.016.
218. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(11):703-717. doi: 10.1038/nri.2017.75.
219. Ono M, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature.* 2007;446(7136):685-9. doi: 10.1038/nature05673.
220. Bandukwala HS, et al. Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity.* 2011;34(4):479-91. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.017.
221. Vent-Schmidt J, et al. The role of FOXP3 in regulating immune responses. *Int Rev Immunol.* 2014;33(2):110-28. doi: 10.3109/08830185.2013.811657.
222. Ramsdell F, Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):343-9. doi: 10.1038/nri3650.
223. Passerini L, et al. Forkhead box P3: the peacekeeper of the immune system. *Int Rev Immunol.* 2014;33(2):129-45. doi: 10.3109/08830185.2013.863303.
224. Suri-Payer E, Fritzsching B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(1):3-16. doi: 10.1007/s00281-006-0021-8.
225. Alvarado-Sánchez B, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2006;27(2):110-8. doi: 10.1016/j.jaut.2006.06.005.
226. Accapezzato D, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 2004;113(7):963-72. doi: 10.1172/JCI20515.
227. Langhans B, et al. Increased peripheral CD4<sup>+</sup> regulatory T cells persist after successful direct-acting antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2017;66(5):888-896. doi: 10.1016/j.jhep.2016.12.019.
228. Rodríguez-Iñigo E, et al. Histological damage in chronic hepatitis C is not related to the extent of infection in the liver. *Am J Pathol.* 1999;154(6):1877-81. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65445-4.
229. Sugimoto K, et al. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology.* 2003;38(6):1437-48. doi: 10.1016/j.hep.2003.09.026.

230. Cabrera R, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004;40(5):1062-71. doi: 10.1002/hep.20454.
231. Zhai N, et al. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(6):743-9. doi: 10.1038/cmi.2014.119.
232. Bolacchi F, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(2):188-96. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03048.x.
233. Itose I, et al. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J Viral Hepat*. 2009;16(12):844-52. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01131.x.
234. Sturm N, et al. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. *J Hepatol*. 2010;53(1):25-35. doi: 10.1016/j.jhep.2010.02.024.
235. Delhem N, et al. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. *Bull Cancer*. 2008;95(11):1029-38. French. doi: 10.1684/bdc.2008.0752.
236. Langhans B, et al. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2013;59(2):229-35. doi: 10.1016/j.jhep.2013.04.011.
237. Ward SM, et al. Quantification and localisation of FOXP3<sup>+</sup> T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol*. 2007;47(3):316-24. doi: 10.1016/j.jhep.2007.03.023.
238. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64. doi: 10.1038/nrc3239.
239. Ishida Y, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
240. Agata Y, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):765-72. doi: 10.1093/intimm/8.5.765.
241. Nishimura H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80089-8.
242. Wang J, et al. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int Immunol*. 2010;22(6):443-52. doi: 10.1093/intimm/dxq026.
243. Odorizzi PM, et al. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*. 2015;212(7):1125-37. doi: 10.1084/jem.20142237.
244. Fuertes Marraco SA, et al. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2015 26;6:310. doi: 10.3389/fimmu.2015.00310.
245. Jubel JM, et al. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol*. 2020;11:487. doi: 10.3389/fimmu.2020.00487.
246. Blackburn SD, et al. Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29-37. doi: 10.1038/ni.1679.

247. Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity*. 2016;44(5):1052-68. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.022.
248. de la Cruz-Merino L, et al. Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist*. 2008;13(12):1246-54. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0166.
249. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106. doi: 10.1097/COC.000000000000239.
250. Patsoukis N, et al. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci Adv*. 2020;6(38):eabd2712. doi: 10.1126/sciadv.abd2712.
251. Zhang X, et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*. 2004;20(3):337-47. doi: 10.1016/s1074-7613(04)00051-2.
252. Hui E, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. 2017;355(6332):1428-1433. doi: 10.1126/science.aaf1292.
253. Latchman Y, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-8. doi: 10.1038/85330.
254. Boenisch O, Sayegh MH, Najafian N. Negative T-cell costimulatory pathways: their role in regulating alloimmune responses. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(4):373-8. doi: 10.1097/MOT.0b013e328306117f.
255. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153-167. doi: 10.1038/nri.2017.108.
256. Sharpe AH, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8(3):239-45. doi: 10.1038/ni1443.
257. Francisco et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-29. doi: 10.1084/jem.20090847.
258. Wu K, et al. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(4):269-75. PMID: 17764617.
259. McGrath MM, Najafian N. The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. *Front Immunol*. 2012;3:47. doi: 10.3389/fimmu.2012.00047.
260. Keir ME, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
261. Liang SC, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2706-16. doi: 10.1002/eji.200324228.
262. Odorizzi PM, Wherry EJ. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J Immunol*. 2012;188(7):2957-65. doi: 10.4049/jimmunol.1100038.
263. Schönrich G, Raftery MJ. The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:207. doi: 10.3389/fcimb.2019.00207.
264. Rao M, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int J Infect Dis*. 2017;56:221-228. doi: 10.1016/j.ijid.2017.01.028.

265. Penna A, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2007;45(3):588-601. doi: 10.1002/hep.21541.
266. Radziewicz H, et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol*. 2007;81(6):2545-53. doi: 10.1128/JVI.02021-06.
267. Chang HN, et al. Blocking of the PD-1/PD-L1 Interaction by a D-Peptide Antagonist for Cancer Immunotherapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54(40):11760-4. doi: 10.1002/anie.201506225.
268. Urbani S, et al. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J Hepatol*. 2008;48(4):548-58. doi: 10.1016/j.jhep.2007.12.014.
269. Gouw AS, Clouston AD, Theise ND. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology*. 2011;54(5):1853-63. doi: 10.1002/hep.24613.
270. Bankhead P, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
271. Mazzaro C, et al. A Review on Extrahepatic Manifestations of Chronic Hepatitis C Virus Infection and the Impact of Direct-Acting Antiviral Therapy. *Viruses*. 2021;13(11):2249. doi: 10.3390/v13112249.
272. Goto K, et al. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: When the Host Loses Its Grip. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3057. doi: 10.3390/ijms21093057.
273. Mahale P, et al. The effect of sustained virological response on the risk of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Gut*. 2018;67(3):553-561. doi: 10.1136/gutjnl-2017-313983.
274. Pawlotsky JM. Interferon-Free Hepatitis C Virus Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(11):a036855. doi: 10.1101/cshperspect.a036855.
275. Stanciu C, et al. An update on direct antiviral agents for the treatment of hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother*. 2021;22(13):1729-1741. doi: 10.1080/14656566.2021.1921737.
276. Orr C, et al. Characterization of changes in intrahepatic immune cell populations during HCV treatment with sofosbuvir and ribavirin. *J Viral Hepat*. 2019;26(3):323-328. doi: 10.1111/jvh.13034.
277. George SL, et al. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: a 5-year follow-up of 150 patients. *Hepatology*. 2009;49(3):729-38. doi: 10.1002/hep.22694.
278. Lee YA, Friedman SL. Reversal, maintenance or progression: what happens to the liver after a virologic cure of hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014;107:23-30. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.03.012.
279. Tsubota A, et al. Time course of histological changes in patients with a sustained biochemical and virological response to interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 1997;27(1):49-55. doi: 10.1016/s0168-8278(97)80279-6.
280. Tsuda N, et al. Long-term clinical and virological outcomes of chronic hepatitis C after successful interferon therapy. *J Med Virol*. 2004;74(3):406-13. doi: 10.1002/jmv.20190.
281. Shiffman ML, et al. Long term changes in liver histology following treatment of chronic hepatitis C virus. *Ann Hepatol*. 2014;13(4):340-9.
282. Chu CY, et al. Long-term histological change in chronic hepatitis C patients who had received peginterferon plus ribavirin therapy with sustained virological

- response. *J Formos Med Assoc.* 2019;118(7):1129-1137. doi: 10.1016/j.jfma.2018.11.005.
283. Mendes LS, et al. Prognostic factors for progression of liver structural lesions in chronic hepatitis C patients. *World J Gastroenterol.* 2008;14(16):2522-8. doi: 10.3748/wjg.14.2522.
284. Poynard T, et al. Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2013;59(4):675-83. doi: 10.1016/j.jhep.2013.05.015.
285. Huang R, et al. Histopathology and the predominantly progressive, indeterminate and predominately regressive score in hepatitis C virus patients after direct-acting antivirals therapy. *World J Gastroenterol.* 2021;27(5):404-415. doi: 10.3748/wjg.v27.i5.404.
286. Ko S, et al. Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:23-50. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032824.
287. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* 2003;120(1):117-30. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00338-6.
288. Libbrecht L, et al. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol.* 2000;192(3):373-8. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH700>3.0.CO;2-5.
289. Noritake H, et al. Successful Interferon Therapy Reverses Enhanced Hepatic Progenitor Cell Activation in Patients with Chronic Hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res.* 2015;35(12):956-62. doi: 10.1089/jir.2014.0197.
290. Tsamandas AC, et al. Potential role of hepatic progenitor cells expression in cases of chronic hepatitis C and their relation to response to therapy: a clinicopathologic study. *Liver Int.* 2006;26(7):817-26. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01306.x.
291. Chobert MN, et al. Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats. *Lab Invest.* 2012;92(1):135-50. doi: 10.1038/labinvest.2011.143.
292. Kuramitsu K, et al. Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am J Pathol.*;183(1):182-94. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.03.018.
293. Dechêne A, et al. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation. *Hepatology.* 2010;52(3):1008-16. doi: 10.1002/hep.23754.
294. Helal TESA, et al. Relationship between hepatic progenitor cells and stellate cells in chronic hepatitis C genotype 4. *APMIS.* 2018;126(1):14-20. doi: 10.1111/apm.12787.
295. Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marzioni M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int.* 2008;28(8):1052-64. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01825.x.
296. Lowes KN, et al. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol.* 1999;154(2):537-41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65299-6.
297. Marshall A, et al. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2005;128(1):33-42. doi: 10.1053/j.gastro.2004.09.076.

298. Kannan RP, et al. Hepatitis C virus infection causes cell cycle arrest at the level of initiation of mitosis. *J Virol.* 2011;85(16):7989-8001. doi: 10.1128/JVI.00280-11.
299. Napoli J, et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology.* 1996;24(4):759-65. doi: 10.1002/hep.510240402.
300. Gochee PA, et al. Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(4):386-92. doi: 10.1046/j.1440-1746.2003.02984.x.
301. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
302. Ravuri C, et al. Endogenous production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase complexes is a determinant of  $\gamma$ -glutamyltransferase expression. *Free Radic Res.* 2011;45(5):600-10. doi: 10.3109/10715762.2011.564164.
303. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis.* 2003;23(4):385-96. doi: 10.1055/s-2004-815564.
304. Ali F, et al. Flow cytometry assessment of monocyte subsets alteration in hepatocellular carcinoma post hepatitis C virus infection. *Egypt J Immunol.* 2022;29(4):33-45.
305. Perrella A, et al. Flow cytometry assay of myeloid dendritic cells (mDCs) in peripheral blood during acute hepatitis C: possible pathogenetic mechanisms. *World J Gastroenterol.* 2006;12(7):1105-9. doi: 10.3748/wjg.v12.i7.1105.
306. Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007;4(11):622-34. doi: 10.1038/ncpgasthep0961.
307. Rehermann B. HCV in 2015: Advances in hepatitis C research and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(2):70-2. doi: 10.1038/nrgastro.2015.227.
308. Jones RB, Walker BD. HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells and HIV eradication. *J Clin Invest.* 2016;126(2):455-63. doi: 10.1172/JCI80566.
309. Shrivastava S, et al. Augmentation of hepatitis C virus-specific immunity and sustained virologic response. *J Viral Hepat.* 2017;24(9):742-749. doi: 10.1111/jvh.12702.
310. Osinusi A, et al. Sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C genotype 1 in patients with unfavorable treatment characteristics: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2013;310(8):804-11. doi: 10.1001/jama.2013.109309.
311. Spaan M, et al. Immunological Analysis During Interferon-Free Therapy for Chronic Hepatitis C Virus Infection Reveals Modulation of the Natural Killer Cell Compartment. *J Infect Dis.* 2016;213(2):216-23. doi: 10.1093/infdis/jiv391.
312. Bolte FJ, et al. Intra-Hepatic Depletion of Mucosal-Associated Invariant T Cells in Hepatitis C Virus-Induced Liver Inflammation. *Gastroenterology.* 2017;153(5):1392-1403.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.043.
313. Pisano MB, et al. Viral hepatitis update: Progress and perspectives. *World J Gastroenterol.* 2021;27(26):4018-4044. doi: 10.3748/wjg.v27.i26.4018.
314. Wedemeyer H, et al. Reversal of Immunity After Clearance of Chronic HCV Infection-All Reset? *Front Immunol.* 2020;11:571166. doi: 10.3389/fimmu.2020.571166.
315. Debes JD, et al. Levels of Cytokines in Serum Associate With Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients With HCV Infection Treated With Direct-

- Acting Antivirals. *Gastroenterology*. 2018;154(3):515-517.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.035.
316. Shrivastava S, et al. Multitarget Direct-Acting Antiviral Therapy Is Associated With Superior Immunologic Recovery in Patients Coinfected With Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus. *Hepatology*. 2018;2(12):1451-1466. doi: 10.1002/hep4.1258.
  317. Khan O, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *Nature*. 2019;571(7764):211-218. doi: 10.1038/s41586-019-1325-x.
  318. Smits M, et al. Follicular T helper cells shape the HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell repertoire after virus elimination. *J Clin Invest*. 2020;130(2):998-1009. doi: 10.1172/JCI129642.
  319. Bandera A, et al. The impact of DAA-mediated HCV eradication on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte trajectories in HIV/HCV coinfecting patients: Data from the ICONA Foundation Cohort. *J Viral Hepat*. 2021;28(5):779-786. doi: 10.1111/jvh.13488.
  320. Angelidakis G, et al. Impact of CD4<sup>+</sup> T-cell count on sustained virologic response to direct-acting antivirals in hepatitis C virus mono-infected cancer patients: a prospective observational study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022;103(3):115719. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115719.
  321. Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med*. 2013;19(7):859-68. doi: 10.1038/nm.3251.
  322. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*. 2015;479-480:180-93. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.033.
  323. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004;78(11):5535-45. doi: 10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004.
  324. Freeman GJ, et al. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*. 2006;203(10):2223-7. doi: 10.1084/jem.20061800.
  325. Ji XJ, et al. HCV-infected hepatocytes drive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development through the Tim-3/Gal-9 pathway. *Eur J Immunol*. 2013;43(2):458-67. doi: 10.1002/eji.201242768.
  326. Marie JC, et al. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005;201(7):1061-7. doi: 10.1084/jem.20042276.
  327. Urbani S, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol*. 2006;80(22):11398-403. doi: 10.1128/JVI.01177-06.
  328. Wang BJ, et al. Immunostaining of PD-1/PD-Ls in liver tissues of patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17(28):3322-9. doi: 10.3748/wjg.v17.i28.3322.
  329. Viratham Pulsawatdi A, et al. A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment. *Mol Oncol*. 2020;14(10):2384-2402. doi: 10.1002/1878-0261.12764.
  330. Yeong J, et al. Multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence (mIHC/IF) for PD-L1 testing in triple-negative breast cancer: a translational assay compared with conventional IHC. *J Clin Pathol*. 2020;73(9):557-562. doi: 10.1136/jclinpath-2019-206252.
  331. Erjefält JS, et al. Diffuse alveolar damage patterns reflect the immunological and molecular heterogeneity in fatal COVID-19. *EBioMedicine*. 2022;83:104229. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104229.

## ANEXO A – Dados demográficos e clínicos dos pacientes de estudo

Tabela 28. Dados demográficos e clínicos dos pacientes de estudo

ID Paciente	Gênero	Idade	Genótipo HCV
AP19-15731	M	59	1
2017-00435	M	67	3
2017-16355	F	56	1a
AP20-11370	M	61	1a
AP18-15160	M	56	3
2017-21430	F	58	1a
2017-35700	M	49	1b
2016-10074	F	45	1b
AP17-851	M	56	1a
AP21-44	M	68	1b
AP19-5815	F	60	1
AP20-7902	M	55	1b
AP20-9971	F	65	1a
AP19-14440	M	69	3
2016-11842	M	60	1b
2016-391	M	56	1a
AP18-7649	M	38	1a
AP19-10890	M	52	1a
2016-33578	M	47	1b
2017-29103	M	65	3
AP19-25064	F	45	1a
AP19-25670	F	57	1a
2016-11988	F	56	1a
AP21-1074	F	66	3
AP20-12079	F	51	1a
2017-16193	M	38	1a
AP19-17230	F	53	1a
AP18-8347	M	54	1a
2016-15692	M	46	1a
AP18-17989	M	41	1a
AP19-6119	F	39	1a
2017-29874	M	56	1a
AP17-3	M	66	3
2016-23870	M	47	1
2016-11838	F	58	1a
AP20-10832	M	42	3
2017-23508	M	54	3
21-15422	M	55	1
21-6708	M	69	3
21-14113	M	45	1
21-3707	F	61	1
21-6572	M	71	1

**Abreviaturas:** M, masculino; F, feminino; HCV, vírus da hepatite C.



**Tabela 29.** Dados pré transplante dos pacientes de estudo

ID Paciente	Tratamento pré transplante	Data início do tratamento	Data término do tratamento	Carga viral (UI/mL)	Data do transplante	Meld pré transplante
AP19-15731	Sim	12/12/2016	06/03/2017	ALD	26/07/2019	13/29
2017-00435	Sim	08/09/2016	01/12/2016	ALD	05/01/2017	16/20
2017-16355	Não			148646	28/05/2017	12/24
AP20-11370	Sim	30/01/2020	23/04/2020	ALD	06/10/2020	11/24
AP18-15160	Sim	07/11/2016	30/01/2017	ALD	18/07/2018	13/24
2017-21430	Sim	21/06/2016	02/12/2016	ALD	12/07/2017	20
2017-35700	Sim	25/01/2016	11/07/2016	ALD	13/11/2017	26/29
2016-10074	Sim	11/01/2016	27/06/2016	ALD	30/03/2016	16
AP17-851	Não			1614754	12/12/2017	10/29
AP21-44	Sim	03/07/2017	25/09/2017	ALD	31/12/2020	21/20
AP19-5815	Sim	2016		ALD	20/03/2019	15/24
AP20-7902	Não			37993	16/07/2020	18/24
AP20-9971	Sim	2017		ALD	12/09/2020	13/29
AP19-14440	Não			363907	11/07/2019	10/29
2016-11842	Não			6455773	13/04/2016	16
2016-391	Não			698947	06/01/2016	18/29
AP18-7649	Sim	09/01/2017	12/07/2017	ALD	11/04/2018	12
AP19-10890	Não			3840916	22/05/2019	20/24
2016-33578	Sim	17/05/2016	01/11/2016	ALD	23/10/2016	16/20
2017-29103	Sim	26/01/2017	13/07/2017	ALD	15/09/2017	13/24
AP19-25064	Não			633459	13/11/2019	09/24
AP19-25670	Sim	14/03/2017	06/06/2017	ALD	23/11/2019	19/29
2016-11988	Não			133824	15/04/2016	14/29
AP21-1074	Sim	23/01/2017	17/04/2017	ALD	20/01/2021	08/24
AP20-12079	Não			1137721	16/10/2020	33
2017-16193	Sim	20/06/2016	05/12/2016	ALD	26/05/2017	17
AP19-17230	Sim	2016		ALD	14/08/2019	41
AP18-8347	Sim	30/01/2017	17/07/2017	ALD	19/04/2018	17/24
2016-15692	Não			30680	16/05/2016	31
AP18-17989	Sim	30/08/2017	29/11/2017	ALD	20/08/2018	12/20
AP19-6119	Sim	29/11/2017	16/05/2018	ALD	24/03/2019	08/24
2017-29874	Não			2829268	21/09/2017	16/24
AP17-3	Não			1949845	01/12/2017	10/20
2016-23870	Não			227	30/07/2016	41
2016-11838	Não			23461	13/04/2016	39
AP20-10832	Não			54420	27/09/2020	25
2017-23508	Não			19396	29/07/2017	31
21-15422	Não			179311	27/09/2021	12/29
21-6708	Não				05/05/2021	12/20
21-14113	Não			4651944	08/09/2021	11/29
21-3707	Sim	2017	2017	ALD	04/03/2021	15/24
21-6572	Sim	01/02/2020	01/07/2020	ALD	03/05/2021	36

**Abreviatura:** ALD, abaixo do limite de detecção.

**ANEXO B** – Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas analisadas

**Tabela 30.** Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas necro-inflamatórias

<b>ID Paciente</b>	<b>Grupo</b>	<b>Inflamação portal e septal</b>	<b>Atividade de interface</b>	<b>Necrose lítica focal</b>	<b>Necrose confluenta</b>
AP19-15731	Tratado	2	2	1	0
2017-00435	Tratado	3	3	1	0
2017-16355	Não Tratado	2	2	1	0
AP20-11370	Tratado	2	2	1	0
AP18-15160	Tratado	1	1	2	0
2017-21430	Tratado	2	2	3	1
2017-35700	Tratado	2	3	2	0
2016-10074	Tratado	3	3	2	0
AP17-851	Não Tratado	2	2	2	0
AP21-44	Tratado	1	1	1	0
AP19-5815	Tratado	2	1	1	0
AP20-7902	Não Tratado	3	3	2	0
AP20-9971	Tratado	1	1	1	0
AP19-14440	Não Tratado	3	2	2	0
2016-11842	Não Tratado	3	3	2	0
2016-391	Não Tratado	3	3	2	0
AP18-7649	Tratado	2	2	0	0
AP19-10890	Não Tratado	1	2	2	1
2016-33578	Tratado	2	2	2	0
2017-29103	Tratado	3	2	1	0
AP19-25064	Não Tratado	3	3	1	0
AP19-25670	Tratado	1	1	1	0
2016-11988	Não Tratado	2	2	1	0
AP21-1074	Tratado	1	1	1	0
AP20-12079	Não Tratado	3	2	1	0
2017-16193	Tratado	3	3	2	1
AP19-17230	Tratado	1	1	1	0
AP18-8347	Tratado	2	1	1	0
2016-15692	Não Tratado	3	3	2	2
AP18-17989	Tratado	2	3	1	0
AP19-6119	Tratado	1	1	1	0
2017-29874	Não Tratado	2	3	2	0
AP17-3	Não Tratado	3	3	3	0
2016-23870	Não Tratado	4	4	2	3
2016-11838	Não Tratado	2	3	1	0
AP20-10832	Não Tratado	2	3	1	2
2017-23508	Não Tratado	3	3	1	0
21-15422	Não Tratado	3	2	2	0
21-6708	Não Tratado	2	2	1	0
21-14113	Não Tratado	2	2	2	1
21-3707	Tratado	1	2	2	0
21-6572	Tratado	2	1	2	0

**Tabela 31.** Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas de alterações arquiteturais

<b>ID Paciente</b>	<b>Grupo</b>	<b>Estadiamento de cirrose</b>	<b>Regressão de fibrose</b>
AP19-15731	Tratado	4B	3
2017-00435	Tratado	4C	1
2017-16355	Não Tratado	4C	1
AP20-11370	Tratado	4B	0
AP18-15160	Tratado	4B	0
2017-21430	Tratado	4A	2
2017-35700	Tratado	4C	1
2016-10074	Tratado	4A	2
AP17-851	Não Tratado	4A	2
AP21-44	Tratado	4A	2
AP19-5815	Tratado	4B	2
AP20-7902	Não Tratado	4B	1
AP20-9971	Tratado	4C	1
AP19-14440	Não Tratado	4A	2
2016-11842	Não Tratado	4B	0
2016-391	Não Tratado	4B	0
AP18-7649	Tratado	4C	0
AP19-10890	Não Tratado	4A	3
2016-33578	Tratado	4A	2
2017-29103	Tratado	4B	1
AP19-25064	Não Tratado	4A	2
AP19-25670	Tratado	4B	2
2016-11988	Não Tratado	4B	1
AP21-1074	Tratado	4A	2
AP20-12079	Não Tratado	4B	1
2017-16193	Tratado	4B	1
AP19-17230	Tratado	4A	2
AP18-8347	Tratado	4B	2
2016-15692	Não Tratado	4B	2
AP18-17989	Tratado	4B	1
AP19-6119	Tratado	4A	2
2017-29874	Não Tratado	4B	2
AP17-3	Não Tratado	4B	1
2016-23870	Não Tratado	4C	0
2016-11838	Não Tratado	4B	2
AP20-10832	Não Tratado	4B	0
2017-23508	Não Tratado	4B	2
21-15422	Não Tratado	4C	1
21-6708	Não Tratado	4B	1
21-14113	Não Tratado	4B	2
21-3707	Tratado	4B	2
21-6572	Tratado	4C	1

**Tabela 32.** Graus atribuídos à semiquantificação das variáveis histológicas relacionadas à doença gordurosa

<b>ID Paciente</b>	<b>Grupo</b>	<b>Esteatose</b>	<b>Balonização</b>	<b>Esteato-hepatite</b>
AP19-15731	Tratado	0	0	ausente
2017-00435	Tratado	0	0	ausente
2017-16355	Não Tratado	1	0	ausente
AP20-11370	Tratado	0	0	ausente
AP18-15160	Tratado	1	0	ausente
2017-21430	Tratado	2	2	presente
2017-35700	Tratado	0	0	ausente
2016-10074	Tratado	1	0	ausente
AP17-851	Não Tratado	1	2	presente
AP21-44	Tratado	0	0	ausente
AP19-5815	Tratado	0	0	ausente
AP20-7902	Não Tratado	0	0	ausente
AP20-9971	Tratado	0	0	ausente
AP19-14440	Não Tratado	2	2	presente
2016-11842	Não Tratado	0	0	ausente
2016-391	Não Tratado	0	1	ausente
AP18-7649	Tratado	0	1	ausente
AP19-10890	Não Tratado	0	1	ausente
2016-33578	Tratado	0	0	ausente
2017-29103	Tratado	0	0	ausente
AP19-25064	Não Tratado	1	0	ausente
AP19-25670	Tratado	0	0	ausente
2016-11988	Não Tratado	0	0	ausente
AP21-1074	Tratado	0	0	ausente
AP20-12079	Não Tratado	0	0	ausente
2017-16193	Tratado	0	1	ausente
AP19-17230	Tratado	0	0	ausente
AP18-8347	Tratado	0	0	ausente
2016-15692	Não Tratado	0	0	ausente
AP18-17989	Tratado	0	0	ausente
AP19-6119	Tratado	0	0	ausente
2017-29874	Não Tratado	0	0	ausente
AP17-3	Não Tratado	1	0	ausente
2016-23870	Não Tratado	0	0	ausente
2016-11838	Não Tratado	0	0	ausente
AP20-10832	Não Tratado	0	0	ausente
2017-23508	Não Tratado	0	0	ausente
21-15422	Não Tratado	0	1	ausente
21-6708	Não Tratado	0	0	ausente
21-14113	Não Tratado	0	0	ausente
21-3707	Tratado	0	0	ausente
21-6572	Tratado	0	0	ausente

**ANEXO C** – Tempo de tratamento, variáveis histológicas analisadas e reação para CK7

**Tabela 33.** Tempo de tratamento dos pacientes e semiquantificação atribuída as variáveis histológicas

ID Paciente	Tempo de tto até Tx (meses)	Inflamação portal e septal	Atividade de interface	Necrose lítica focal	Necrose confluyente	Estadiamento de cirrose	Regressão de fibrose	Esteatose	Balonizacao	Esteatohepatite
2017-00435	4	3	3	1	0	4C	1	0	0	ausente
2016-10074	3	3	3	2	0	4A	2	1	0	ausente
2016-33578	5	2	2	2	0	4A	2	0	0	ausente
AP20-11370	9	2	2	1	0	4B	0	0	0	ausente
2017-29103	7	3	2	1	0	4B	1	0	0	ausente
2017-21430	13	2	2	3	1	4A	2	2	2	presente
AP18-7649	15	2	2	0	0	4C	0	0	1	ausente
2017-16193	11	3	3	2	1	4B	1	0	1	ausente
AP18-8347	14	2	1	1	0	4B	2	0	0	ausente
AP18-17989	11	2	3	1	0	4B	1	0	0	ausente
AP19-6119	16	1	1	1	0	4A	2	0	0	ausente
21-6572	14	2	1	2	0	4C	1	0	0	ausente
AP19-15731	31	2	2	1	0	4B	3	0	0	ausente
AP18-15160	20	1	1	2	0	4B	0	1	0	ausente
2017-35700	22	2	3	2	0	4C	1	0	0	ausente
AP21-44	41	1	1	1	0	4A	2	0	0	ausente
AP19-5815	>12	2	1	1	0	4B	2	0	0	ausente
AP20-9971	>12	1	1	1	0	4C	1	0	0	ausente
AP19-25670	32	1	1	1	0	4B	2	0	0	ausente
AP21-1074	47	1	1	1	0	4A	2	0	0	ausente
AP19-17230	>12	1	1	1	0	4A	2	0	0	ausente
21-3707	36	1	2	2	0	4B	2	0	0	ausente

**Abreviatura:** tto, tratamento; Tx, transplante.

**Tabela 34.** Tempo de tratamento dos pacientes e semiquantificação atribuída à reação para CK7

ID Paciente	Tempo de tto até Tx (meses)	CPI zona 1	CPI zonas 2 e 3	EDI zona 1	EDI zonas 2 e 3	RD
2017-00435	4	1	1	2	1	1
2016-10074	3	1	1	1	1	1
2016-33578	5	1	1	1	1	1
AP20-11370	9	1	0	1	0	1
2017-29103	7	1	1	1	1	1
2017-21430	13	1	1	2	2	1
AP18-7649	15	1	0	2	0	2
2017-16193	11	1	1	2	1	2
AP18-8347	14	1	1	1	1	1
AP18-17989	11	1	1	1	1	1
AP19-6119	16	1	2	1	2	1
21-6572	14	1	1	2	1	1
AP19-15731	31	1	1	1	1	1
AP18-15160	20	1	1	1	1	1
2017-35700	22	1	1	2	1	2
AP21-44	41	1	1	1	1	1
AP19-5815	>12	1	1	1	1	1
AP20-9971	>12	1	1	2	1	1
AP19-25670	32	1	1	1	1	1
AP21-1074	47	1	1	1	1	1
AP19-17230	>12	1	1	1	1	1
21-3707	36	1	1	2	1	2

**Abreviatura:** tto, tratamento; Tx, transplante; CPI, célula progenitora isolada; EDI, estrutura progenitora isolada; RD, reação ductular.

## ANEXO D – Graus atribuídos à semiquantificação da reação para CK7

Tabela 35. Graus atribuídos à semiquantificação da reação para CK7

ID Paciente	Grupo	CPI zona 1	CPI zonas 2 e 3	EDI zona 1	EDI zonas 2 e 3	RD
AP19-15731	Tratado	1	1	1	1	1
2017-00435	Tratado	1	1	2	1	1
2017-16355	Não Tratado	1	1	2	2	2
AP20-11370	Tratado	1	0	1	0	1
AP18-15160	Tratado	1	1	1	1	1
2017-21430	Tratado	1	1	2	2	2
2017-35700	Tratado	1	1	2	1	2
2016-10074	Tratado	1	1	1	1	1
AP17-851	Não Tratado	1	1	2	2	2
AP21-44	Tratado	1	1	1	1	1
AP19-5815	Tratado	1	1	1	1	1
AP20-7902	Não Tratado	1	1	2	3	2
AP20-9971	Tratado	1	1	2	1	1
AP19-14440	Não Tratado	1	2	2	2	2
2016-11842	Não Tratado	1	1	2	2	1
2016-391	Não Tratado	1	1	2	1	2
AP18-7649	Tratado	1	0	2	0	2
AP19-10890	Não Tratado	1	2	2	3	2
2016-33578	Tratado	1	1	1	1	1
2017-29103	Tratado	1	1	1	1	1
AP19-25064	Não Tratado	1	1	2	1	1
AP19-25670	Tratado	1	1	1	1	1
2016-11988	Não Tratado	2	2	2	2	2
AP21-1074	Tratado	1	1	1	1	1
AP20-12079	Não Tratado	1	2	2	2	2
2017-16193	Tratado	1	1	2	1	2
AP19-17230	Tratado	1	1	1	1	1
AP18-8347	Tratado	1	1	1	1	1
2016-15692	Não Tratado	1	2	2	2	3
AP18-17989	Tratado	1	1	1	1	1
AP19-6119	Tratado	1	2	1	2	1
2017-29874	Não Tratado	1	1	1	1	1
AP17-3	Não Tratado	2	1	2	1	2
2016-23870	Não Tratado	1	1	2	1	3
2016-11838	Não Tratado	1	1	2	1	1
AP20-10832	Não Tratado	1	1	2	1	2
2017-23508	Não Tratado	1	2	3	3	3
21-15422	Não Tratado	1	2	2	3	3
21-6708	Não Tratado	1	1	1	1	1
21-14113	Não Tratado	1	1	1	1	1
21-3707	Tratado	1	1	2	1	2
21-6572	Tratado	1	1	2	1	1

**ANEXO E** – Graus atribuídos à quantificação dos marcadores imuno-histoquímicos de subtipos de linfócitos

**Tabela 36.** Quantificação dos marcadores imuno-histoquímicos de subtipos de linfócitos

<b>ID Paciente</b>	<b>Grupo</b>	<b>CD4</b>	<b>CD8</b>	<b>CD20</b>	<b>CD3</b>
AP19-15731	Tratado	24,5	120,72	15,83	61,73
2017-00435	Tratado	15,64	162,15	52,97	203,75
2017-16355	Não Tratado	40,65	441,54	121,82	455,08
AP20-11370	Tratado	1,52	60,78	15,35	18,09
AP18-15160	Tratado	47,88	298,31	12,58	47,82
2017-21430	Tratado	83,34	331,1	79,97	374,42
2017-35700	Tratado	8,76	92,36	18,02	101,99
2016-10074	Tratado	88,82	282,84	65,76	378,71
AP17-851	Não Tratado	90,75	460,29	121,46	184,04
AP21-44	Tratado	4,57	288,35	43,36	245,73
AP19-5815	Tratado	22,02	175,2	23,62	160,25
AP20-7902	Não Tratado	97,52	381,7	151,49	528,33
AP20-9971	Tratado	43,76	522,03	43,38	26,58
AP19-14440	Não Tratado	173,19	347,9	22,09	38,09
2016-11842	Não Tratado	31,15	348,4	120,92	392,29
2016-391	Não Tratado	41,62	122,69	36,37	58,06
AP18-7649	Tratado	41,89	235,33	90,04	327,19
AP19-10890	Não Tratado	173,05	196,15	32,8	143,28
2016-33578	Tratado	33,86	232,97	20,93	198,49
2017-29103	Tratado	14,97	173,57	10,81	264,25
AP19-25064	Não Tratado	107,97	309,24	48,52	102,07
AP19-25670	Tratado	3,01	150	10,54	52,06
2016-11988	Não Tratado	274,49	255,97	24,57	133,32
AP21-1074	Tratado	90,85	39,54	13,4	19,57
AP20-12079	Não Tratado	40,28	151,25	17,62	103,1
2017-16193	Tratado	146,66	448,47	86,53	171,41
AP19-17230	Tratado	19,36	415,85	56,9	324,49
AP18-8347	Tratado	16,74	171,54	89,43	238,78
2016-15692	Não Tratado	32,8	344,91	61,34	136,61
AP18-17989	Tratado	3,89	469,77	18,16	26,53
AP19-6119	Tratado	51,48	321,16	18,98	145,95
2017-29874	Não Tratado	58,24	719,18	20,1	557,71
AP17-3	Não Tratado	63,89	414,87	86,3	535,02
2016-23870	Não Tratado	15,64	586,3	42,72	
2016-11838	Não Tratado	31,29	173,24	73,42	271,45
AP20-10832	Não Tratado	60,96	254,56	38,92	349,76
2017-23508	Não Tratado	29,01	120,72	15,83	61,73
21-15422	Não Tratado	238,65	162,15	52,97	203,75
21-6708	Não Tratado	255,28	441,54	121,82	455,08
21-14113	Não Tratado	201,49	60,78	15,35	18,09
21-3707	Tratado	86,03	298,31	12,58	47,82
21-6572	Tratado	23,82	331,1	79,97	374,42



## ANEXO F – Graus atribuídos à semiquantificação da imunexpressão de PD-1 e FOX-P3

**Tabela 37.** Graus atribuídos à semiquantificação da imunexpressão de PD-1 e FOX-P3

ID Paciente	Grupo	PD-1 Septal	PD-1 Centrolobular	FOX-P3 Septal	FOX-P3 Centrolobular
AP19-15731	Tratado	3	0	4	3
2017-00435	Tratado	4	1	3	1
2017-16355	Não Tratado	2	1	2	1
AP20-11370	Tratado	2	2	3	3
AP18-15160	Tratado	3	2	4	2
2017-21430	Tratado	2	2	2	2
2017-35700	Tratado	3	2	2	1
2016-10074	Tratado	4	2	1	1
AP17-851	Não Tratado	4	3	2	1
AP21-44	Tratado	2	2	3	2
AP19-5815	Tratado	1	0	2	1
AP20-7902	Não Tratado	2	2	4	4
AP20-9971	Tratado	2	1	3	2
AP19-14440	Não Tratado	4	2	3	2
2016-11842	Não Tratado	3	2	1	1
2016-391	Não Tratado	3	2	3	2
AP18-7649	Tratado	3	1	1	2
AP19-10890	Não Tratado	2	1	2	1
2016-33578	Tratado	3	1	4	1
2017-29103	Tratado	3	2	4	2
AP19-25064	Não Tratado	2	1	3	2
AP19-25670	Tratado	2	1	2	2
2016-11988	Não Tratado	4	3	1	1
AP21-1074	Tratado	3	2	4	2
AP20-12079	Não Tratado	1	1	1	1
2017-16193	Tratado	3	2		
AP19-17230	Tratado	1	0	1	1
AP18-8347	Tratado	2	2	3	3
2016-15692	Não Tratado	3	2	1	1
AP18-17989	Tratado	2	0		
AP19-6119	Tratado	3	1	3	3
2017-29874	Não Tratado	2	2	2	1
AP17-3	Não Tratado	3	2	2	2
2016-23870	Não Tratado	2	1	1	0
2016-11838	Não Tratado	2	1	1	1
AP20-10832	Não Tratado	3	0	4	3
2017-23508	Não Tratado	3	2	1	1
21-15422	Não Tratado	3	2	4	4
21-6708	Não Tratado	4	3	2	2
21-14113	Não Tratado	3	2	2	2
21-3707	Tratado			2	2
21-6572	Tratado	3	1	2	1