

ALINE KAWASSAKI ASSATO

Avaliação de marcadores histológicos e imuno-histoquímicos em amostras hepáticas de pacientes soropositivos para hepatite C com ênfase aos padrões de vasos sanguíneos e linfáticos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Faculdade de Medicina da USP quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD))

São Paulo

2021

ALINE KAWASSAKI ASSATO

Avaliação de marcadores histológicos e imuno-histoquímicos em amostras hepáticas de pacientes soropositivos para hepatite C com ênfase aos padrões de vasos sanguíneos e linfáticos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Faculdade de Medicina da USP quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD))

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Assato, Aline Kawassaki

Avaliação de marcadores histológicos e imuno-
histoquímicos em amostras hepáticas de pacientes
soropositivos para hepatite C com ênfase aos
padrões de vasos sanguíneos e linfáticos / Aline
Kawassaki Assato. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Hepatite C crônica 2.Imuno-
histoquímica 3.Vasos sanguíneos 4.Vasos linfáticos
5.Linfangiogênese 6.Neovascularização patológica
7.Fígado 8.Patologia

USP/FM/DBD-244/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*A Deus,
aos meus pais Keiko e Sérgio,
à minha irmã Fabiana e cunhado Daniel,
ao meu filho Davi e às minhas sobrinhas Elisa e Marina,
e ao meu esposo Leonardo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida, oportunidades, força e fé de sempre seguir em frente.

Ao Professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves pela orientação, ensinamentos, compreensão, confiança, suporte e por contribuição para o meu desenvolvimento profissional e científico.

À Alda Wakamatsu pelos ensinamentos, apoio, compreensão, confiança, incentivo, suporte, ótimos momentos e conversas e contribuição para o meu desenvolvimento profissional e científico.

À Cinthya Cirqueira pela dicas, apoio, incentivo, desabafos e ótimas conversas.

À Melissa Rats e Denise Rodrigues pelo apoio, compreensão, incentivo, desabafos, ótimas conversas e risadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Faculdade de Medicina pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus pais e irmã pelo amor, apoio, incentivo, compreensão que me ajudaram a trilhar mais um caminho.

Ao meu esposo pelo amor, compreensão, paciência, apoio e por tudo que passamos juntos.

Ao meu filho que é a força para enfrentar todos os desafios.

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta nesta jornada!

EPÍGRAFE

“[] Até aqui o Senhor nos ajudou”

(1 Samuel 7:12)

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento;”*

(Provérbios 3:13)

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

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

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

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

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1.1. Vasos sanguíneos | 2 |
| 1.1.2. Vasos Linfáticos | 4 |
| 1.2.1. Aspectos da angiogênese relacionada à Hepatite C | 8 |
| 1.3.1. Aspectos morfológicos e moleculares da formação de vasos linfáticos | 9 |
| 1.3.2. Marcadores imuno-histoquímicos de endotélio linfático | 11 |
| 1.3.2.1. Podoplanina – Marcador específico de endotélio linfático | 12 |
| 1.3.3. Linfangiogênese hepática | 12 |
| 1.4.1. Hepatite C Crônica | 16 |
| 1.4.2. Diagnóstico | 17 |
| 1.4.3. Genótipos do Vírus da Hepatite C | 20 |
| 1.4.4. Histopatologia das Hepatites | 20 |
| 1.4.4.1. Peculiaridades da histopatologia da Hepatite C | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 3. METODOLOGIA | 25 |
| 3.5.1. Anticorpos primários | 38 |
| 3.5.2. Reações imuno-histoquímicas | 39 |
| 3.6.1. Componentes sanguíneos | 42 |
| 3.6.1.1. Brotos sanguíneos portais (BSP) | 42 |
| 3.6.1.2. Vasos sanguíneos portais (VSP) | 43 |
| 3.6.1.3. Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | 44 |
| 3.6.1.4. Brotos sanguíneos na interface (BSI) | 45 |
| 3.6.1.5. Vasos sanguíneos na interface (VSI) | 46 |
| 3.6.1.6. Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | 47 |
| 3.6.1.7. Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | 48 |
| 3.6.1.8. Vasos sanguíneos muscularizados no parênquima (VSMPA) | 49 |
| 3.6.2. Componentes linfáticos | 50 |
| 3.6.2.1. Brotos linfáticos portais (BLP) | 50 |
| 3.6.2.2. Vasos linfáticos portais (VLP) | 51 |
| 3.6.2.3. Brotos linfáticos na interface (BLI) | 52 |
| 3.6.2.4. Vasos linfáticos na interface (VLI) | 53 |
| 3.6.2.5. Brotos linfáticos no parênquima (BLPA) | 53 |
| 3.6.2.6. Vasos linfáticos no parênquima (VLPA) | 53 |
| 4. RESULTADOS | 55 |
| 4.1.1. Lesões associadas à hepatite C crônica | 56 |

| | |
|--|----|
| 4.1.2. Lesões associadas à doença gordurosa do fígado | 57 |
| 4.3.1. Distribuição dos valores quantitativos de brotos sanguíneos marcados pela reatividade de seu endotélio para CD34 | 58 |
| 4.3.2. Distribuição dos valores quantitativos de vasos sanguíneos muscularizados marcados pela reatividade de sua camada muscular para actina de músculo liso com anticorpo 1A4..... | 59 |
| 4.4.1. Comparação entre os valores quantitativos de brotos, vasos sanguíneos e vasos sanguíneos muscularizados portais..... | 60 |
| 4.4.2. Análise comparativa entre a distribuição das variáveis imuno-histoquímicas no espaço porta e lesões associadas à hepatite C crônica..... | 62 |
| 4.4.2.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e lesões associadas à hepatite C crônica..... | 62 |
| 4.4.2.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e lesões associadas à doença gordurosa do fígado | 71 |
| 4.4.2.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e o genótipo do VHC | 72 |
| 4.4.3. Comparação entre os valores quantitativos de brotos e vasos sanguíneos na interface..... | 73 |
| 4.4.4. Análise comparativa entre a distribuição das variáveis imuno-histoquímicas na interface e lesões associadas à hepatite C crônica | 74 |
| 4.4.4.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos na interface e lesões associadas à hepatite C crônica..... | 74 |
| 4.4.4.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos na interface e lesões associadas à doença gordurosa do fígado | 78 |
| 4.4.4.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos na interface e o genótipo do VHC | 79 |
| 4.4.5. Comparação entre os valores quantitativos de brotos e vasos sanguíneos no parênquima | 80 |
| 4.4.6. Análise comparativa entre a distribuição das variáveis imuno-histoquímicas no parênquima e lesões associadas à hepatite C crônica..... | 81 |
| 4.4.6.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos no parênquima e lesões associadas à hepatite C crônica..... | 81 |
| 4.4.6.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e lesões associadas à doença gordurosa do fígado | 85 |
| 4.4.6.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos no parênquima e o genótipo do VHC | 87 |
| 4.5.1. DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES QUANTITATIVOS DE BROTOS E VASOS LINFÁTICOS MARCADOS PELA REATIVIDADE DE SEU ENDOTÉLIO PARA PODOPLANINA..... | 87 |
| 4.6.1. Comparação entre os valores quantitativos de brotos e vasos linfáticos portais | 89 |
| 4.6.2. Análise comparativa entre a distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e lesões histológicas | 89 |
| 4.6.2.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e lesões associadas à hepatite C crônica | 89 |
| 4.6.2.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e lesões associadas à doença gordurosa do fígado..... | 95 |
| 4.6.2.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e o genótipo do VHC | 97 |
| 4.7.1. Análise comparativa entre os genótipos e lesões associadas à hepatite C crônica | 98 |
| 4.7.1.1. Distribuição dos genótipos e lesões associadas à hepatite C crônica..... | 98 |
| 4.7.1.2. Distribuição dos genótipos e lesões associadas à doença gordurosa do fígado | 99 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5. | DISCUSSÃO | 101 |
| 5.2.1. | Estadiamento das lesões da arquitetura hepática | 105 |
| 5.3.1. | Atividade necro-inflamatória portal/septal..... | 107 |
| 5.3.2. | Atividade necro-inflamatória periportal/Hepatite de Interface | 108 |
| 5.3.3. | Atividade necro-inflamatória parenquimatosa/ intralobular | 110 |
| 5.6.1. | Angiogênese sanguínea portal | 116 |
| | | |
| 7. | ANEXO..... | 135 |
| | | |
| 8. | REFERÊNCIAS..... | 229 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema do processo angiogênico..... | 7 |
| Figura 2 - Fotomicrografia mostram amostras de biópsia de fígado obtidas usando agulhas de calibre 16 (esquerda) e calibre 18 (direita) | 18 |
| Figura 3 - Distribuição do universo de casos | 26 |
| Figura 4 - Fluxograma de casos de Hepatite C incluídos no estudo | 28 |
| Figura 5 - Alterações histológicas mínimas com arquitetura preservada e discreta inflamação portal. (Caso 38, Picrosírius, x200)..... | 34 |
| Figura 6 - Espaço-porta com discreta expansão fibrosa, sem septos (Caso 43, Picrosírius, x200) | 34 |
| Figura 7 - Expansão fibrosa com formação de septos porta-porta (Caso 56, Picrosírius, x100)..... | 35 |
| Figura 8 - Alteração estrutural com septos fibrosos que já contornam esboços nodulares (Caso 23, Picrosírius, x100)..... | 35 |
| Figura 9 - Alteração estrutural com nódulos cirróticos completos (Caso 47, Picrosírius, x40) .. | 36 |
| Figura 10 - Atividade inflamatória portal discreta, com poucos linfócitos portais (Caso 22, H.E., x200)..... | 36 |
| Figura 11 - Número moderado de linfócitos portais. Ausência de hepatite de interface (Caso 72, H.E., x200)..... | 37 |
| Figura 12 - Infiltrado linfocitário portal acentuado. Hepatite de interface discreta (Caso 64, H.E., x200)..... | 37 |
| Figura 13 - Número elevado de brotos sanguíneos portais (Caso 50, IHQ, x40)..... | 43 |
| Figura 14 - Número elevado de vasos sanguíneos portais (Caso 64, IHQ, x40) | 44 |
| Figura 15 - Número elevado de vasos sanguíneos muscularizados portais (Caso 24, IHQ, x20) | 45 |
| Figura 16 - Número elevado de brotos sanguíneos na interface (Caso 16, IHQ, x40)..... | 46 |
| Figura 17 - Número elevado de vasos sanguíneos na interface (Caso 15, IHQ, x40) | 47 |
| Figura 18 - Número elevado de brotos sanguíneos no parênquima (Caso 26, IHQ, x40) | 48 |
| Figura 19 - Número elevado de vasos sanguíneos no parênquima (Caso 52, IHQ, x40)..... | 49 |
| Figura 20 - Número elevado de brotos linfáticos portais (Caso 42, IHQ, x20) | 51 |
| Figura 21 - Número elevado de vasos linfáticos portais (Caso 55, IHQ, x20) | 52 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais..... | 63 |
| Gráfico 2 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais..... | 63 |
| Gráfico 3 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de alteração estrutural | 64 |
| Gráfico 4 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal..... | 66 |
| Gráfico 5 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal..... | 67 |
| Gráfico 6 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal..... | 67 |
| Gráfico 7 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de atividade periportal/perisseptal..... | 68 |
| Gráfico 8 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa | 69 |
| Gráfico 9 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa | 70 |
| Gráfico 10 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de atividade parenquimatosa | 70 |
| Gráfico 11 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais | 75 |
| Gráfico 12 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais | 76 |
| Gráfico 13 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme genótipo | 80 |
| Gráfico 14 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais | 82 |
| Gráfico 15 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal.... | 84 |

| | |
|--|-----|
| Gráfico 16 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de alterações estruturais | 90 |
| Gráfico 17 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de alterações estruturais | 91 |
| Gráfico 18 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de infiltrado inflamatório portal/perisseptal | 92 |
| Gráfico 19 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de infiltrado inflamatório portal/septal | 92 |
| Gráfico 20 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de atividade parenquimatosa | 94 |
| Gráfico 21 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de atividade parenquimatosa | 95 |
| Gráfico 22 - Distribuição de casos por genótipo conforme os graus de esteatose | 100 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Anticorpos primários para estudo do padrão de brotos e vasos e de eventual capilarização e anticorpo primário anti-actina músculo-específica | 39 |
| Tabela 2 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos portais e vasos sanguíneos portais | 60 |
| Tabela 3 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos portais e vasos sanguíneos muscularizados portais | 61 |
| Tabela 4 - Comparação entre os valores de vasos sanguíneos portais e vasos sanguíneos muscularizados portais | 61 |
| Tabela 5 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e alteração estrutural .. | 62 |
| Tabela 6 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e infiltrado inflamatório portal/septal | 65 |
| Tabela 7 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e atividade periportal/perisseptal..... | 66 |
| Tabela 8 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e atividade parenquimatosa | 69 |
| Tabela 9 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e esteatose | 71 |
| Tabela 10 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e esteato-hepatite | 72 |
| Tabela 11 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e genótipo | 73 |
| Tabela 12 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos na interface e vasos sanguíneos na interface..... | 74 |
| Tabela 13 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e alteração estrutural | 75 |
| Tabela 14 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e infiltrado inflamatório portal/septal..... | 76 |
| Tabela 15 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e atividade periportal/perisseptal..... | 77 |
| Tabela 16 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e atividade parenquimatosa | 77 |
| Tabela 17 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e esteatose..... | 78 |
| Tabela 18 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e esteato-hepatite | 79 |
| Tabela 19 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e genótipo | 79 |
| Tabela 20 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos no parênquima e vasos sanguíneos no parênquima..... | 80 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 21 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e alteração estrutural..... | 81 |
| Tabela 22 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e infiltrado inflamatório portal/septal..... | 83 |
| Tabela 23 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e atividade periportal/perisseptal..... | 84 |
| Tabela 24 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e atividade parenquimatosa..... | 85 |
| Tabela 25 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e esteatose .. | 86 |
| Tabela 26 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e esteato-hepatite | 86 |
| Tabela 27 - Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos no parênquima e genótipo..... | 87 |
| Tabela 28 - Comparação entre os valores de brotos linfáticos portais e vasos linfáticos portais..... | 89 |
| Tabela 29 - Distribuição do perfil de vasos linfáticos portais e alteração estrutural | 90 |
| Tabela 30 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e infiltrado inflamatório portal/septal..... | 91 |
| Tabela 31 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e atividade periportal/perisseptal..... | 93 |
| Tabela 32 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e atividade parenquimatosa | 94 |
| Tabela 33 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e esteatose | 96 |
| Tabela 34 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e esteato-hepatite | 96 |
| Tabela 35 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e genótipo | 97 |
| Tabela 36 - Distribuição dos genótipos e alteração estrutural | 98 |
| Tabela 37 - Distribuição dos genótipos e infiltrado inflamatório portal/septal | 98 |
| Tabela 38 - Distribuição dos genótipos e atividade periportal/perisseptal | 99 |
| Tabela 39 - Distribuição dos genótipos e atividade parenquimatosa..... | 99 |
| Tabela 40 - Distribuição dos genótipos e esteatose | 99 |
| Tabela 41 - Distribuição dos genótipos e esteato-hepatite | 100 |

LISTA DE ABREVIATURAS

et al.: e outros

HIF: Fatores de transcrição induzíveis por hipóxia

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

ECM: Matriz extracelular

EC: Células endoteliais

VEGFR-2: Receptor 2 de fator de crescimento endotelial vascular

HGF: Fator de crescimento de hepatócitos

TGF: Fator de crescimento transformador

HIF-1 α : Fator induzível por hipóxia 1 alfa

NO: Óxido nítrico

Prox1: Fator de transcrição prospero homeobox 1

VEGFR-3 ou Flt4: Receptor 3 de fator de crescimento endotelial vascular

CD31: Agrupamento de diferenciação 31

CD34: Agrupamento de diferenciação 34

FLI:1: Fator de transcrição 1 da integração da leucemia

ERG:1: Proteína de resposta ao crescimento precoce 1

LYVE-1: Receptor 1 de hialuronano endotelial do vaso linfático

CCL21: *Ligante* 21 de quimiocina-quimiocina (C-C)

MMR1: Proteína 1 relacionada ao receptor mitocondrial MYO2 1

LEC: Células endoteliais linfáticas

VHC: Vírus da hepatite C

OMS: Organização Mundial de Saúde

CHC: Carcinoma hepatocelular

RSV: Resposta virológica sustentada

RNA: Ácido ribonucleico

D.A.A.: Antivirais de ação direta

AASLD: Associação americana para o estudo de doenças do fígado

IHQ: Imuno-histoquímica

LIM 14: Laboratório de investigação médica em patologia hepática 14 da

FMUSP

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

SBP: Sociedades Brasileiras de Patologia

SBH: Sociedades Brasileiras de Hepatologia

VHB: Vírus da hepatite B

VIH: Vírus da imunodeficiência humana

DAP: Divisão de Anatomia Patológica

PCR: Reação em cadeia de polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

H.E.: Hematoxilina:eosina

BSA: Soro fetal bovino

°C: Grau celsius

pv: Panela elétrica a vapor

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

PBS: Tampão fosfato salino

IgG: Imunoglobulina G

HRP: Peroxidase de rábano silvestre

DAB: 3,3:diaminobenxidina hidrato tetracloridato

ml: Mililitros

BSP: Brotos sanguíneos portais

VSP: Vasos sanguíneos portais

VSMP: Vasos sanguíneos muscularizados portais

BSI: Brotos sanguíneos na interface

VSI: Vasos sanguíneos na interface

BSPA: Brotos sanguíneos no parênquima

VSPA: Vasos sanguíneos no parênquima

VSMPA: Vasos sanguíneos muscularizados no parênquima

BLP: Brotos linfáticos portais

VLP: Vasos linfáticos portais

BLI: Brotos linfáticos na interface

VLI: Vasos linfáticos na interface

BLPA: Brotos linfáticos no parênquima

VLPA: Vasos linfáticos no parênquima

VCAM: Molécula 1 de adesão celular vascular

MAFLD: Doença gordurosa relacionada a distúrbios metabólicos

HSC: Células estreladas hepáticas

Ang: Angiopietina

TGF- β 2 - Fator de crescimento transformador beta 2

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

iNOS-2: Óxido nítrico sintase induzível 2

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

ed.: Edição

IPH: Hipertensão portal idiopática

CCl4: Tetracloreto de carbono

LEC: Célula endotelial hepática

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FGF: Fator de crescimento fibroblasto

PDGF: Fator de crescimento derivado das plaquetas

RESUMO

Assato AK. *Avaliação de marcadores histológicos e imuno-histoquímicos em amostras hepáticas de pacientes soropositivos para hepatite C com ênfase aos padrões de vasos sanguíneos e linfáticos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

INTRODUÇÃO: A Hepatite C crônica é problema relevante de Saúde Pública, mesmo diante da eficácia do tratamento com antivirais de ação direta, sendo ainda preciso conhecer melhor a evolução das alterações histológicas e das manifestações clínicas. **OBJETIVOS:** analisar os principais aspectos histológicos de lesão hepática na Hepatite C crônica e, quando coexistentes, os relacionados à doença gordurosa; comparar a histopatologia nos pacientes infectados pelo genótipo 1 ou pelo genótipo 3 do VHC; quantificar pela imuno-histoquímica os brotos sanguíneos e linfáticos e os vasos sanguíneos e linfáticos “maduros” nos diversos compartimentos do lóbulo hepático; comparar a distribuição dos vasos sanguíneos e linfáticos com as variáveis histológicas de lesão hepática atribuíveis ao VHC e à doença gordurosa. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Amostras obtidas por biópsias hepáticas de 72 casos com hepatite C crônica foram reavaliadas com semiquantificação das alterações estruturais relativas a "estadiamento estrutural" e "atividade necroinflamatória". Reações imuno-histoquímicas foram realizadas com os anticorpos anti-CD34 (QBend), anti-podoplanina (D2-40), anti-actina de músculo liso (1A4). A pesquisa de associação entre as variáveis imuno-histoquímicas, os critérios histológicos e o genótipo foi realizada através do teste Qui-quadrado. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os diferentes graus de alterações estruturais e de atividade necroinflamatória estiveram bem representados nesta casuística (57% casos apresentando formas iniciais (F0-F1-F2) e 43% formas avançadas (F3-F4) e as reações imuno-histoquímicas delinearam com precisão brotos e vasos, permitindo as pesquisas de associação com as variáveis histológicas. Merece destaque o fato de, dentre todos os padrões de alterações histológicas, apenas a presença de esteatose mostrou-se significativamente mais elevada nos casos infectados com o genótipo 3 do VHC. O estudo imuno-histoquímico detectou paralelismo entre o número de brotos e de vasos sanguíneos em cada compartimento, corroborando evidências prévias que demonstram a morfogênese

dos vasos maduros a partir de brotos. O número desses dois padrões de vasos sanguíneos portais aumentou em paralelismo com a progressão das alterações estruturais e com diversos marcadores da atividade necroinflamatória portal, periportal e parenquimatosa, reforçando a íntima associação entre a angiogênese e a atividade inflamatória na hepatite crônica C. De outra parte, não houve paralelismo entre a neoformação de vasos, os marcadores de doença gordurosa e o genótipo viral. Intrigante observação foi o crescimento do número de vasos de parede muscularizada nos espaços-porta principalmente em fases tardias da progressão das alterações estruturais (F3-F4), devendo estudos futuros abordar os mecanismos relacionando tais alterações com o surgimento de hipertensão portal. A quantificação dos brotos sanguíneos no parênquima mostrou-se diretamente relacionada à dos vasos completos. Tais vasos completos no parênquima podem refletir a capilarização dos sinusóides e mostraram-se associados à progressão das alterações estruturais, precedendo mesmo a cirrotização. Ressalte-se aqui a ausência de associação da quantificação dos brotos ou dos vasos sanguíneos no parênquima com os diversos marcadores de atividade necroinflamatória ou de doença gordurosa aqui estudados. Com relação ao estudo dos vasos linfáticos, capítulo importante no qual o presente estudo parece estar entre os pioneiros, a quantidade de brotos e de vasos linfáticos maduros portais mostrou grande paralelismo, assim como havíamos detectado entre brotos e vasos sanguíneos. O aumento do número tanto de brotos como de vasos linfáticos portais mostrou associação direta com a progressão das alterações estruturais e ao grau de infiltrado inflamatório portal/septal e com a atividade necroinflamatória parenquimatosa, mas não com o grau de atividade periportal/periseptal. **CONCLUSÕES:** A identificação de brotos e vasos sanguíneos e linfáticos por métodos imuno-histoquímicos e sua quantificação demonstrou o paralelismo entre a formação dessas duas classes de vasos, especialmente no compartimento portal, e a progressão de alterações estruturais, sendo a neoangiogênese detectada mesmo antes da caracterização histológica da cirrose.

Descritores: Hepatite C crônica; Imuno-histoquímica; Vasos sanguíneos; Vasos linfáticos; Linfangiogênese; Neovascularização patológica; Fígado; Patologia.

ABSTRACT

Assato AK. *Evaluation of histological and immunohistochemical markers in liver samples from hepatitis C seropositive patients with emphasis on patterns of blood and lymph vessels* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

INTRODUCTION: Chronic hepatitis C is a relevant public health problem, even after the introduction of treatment with direct-acting antivirals, since, despite the high rate of virus (HCV) elimination, better understand of the evolution of histological changes and clinical manifestations are still required. **OBJECTIVES:** to analyze the main histological aspects of liver injury in chronic Hepatitis C, also searching for markers of fatty liver disease; to compare histopathology in patients infected by HCV genotype 1 versus genotype 3; to quantify by immunohistochemistry the blood and lymphatic sprouts and the "mature" blood and lymphatic vessels in the various compartments of the hepatic lobule; to compare the distribution of blood and lymphatic vessels with the histological variables of liver injury attributable to HCV and fatty liver disease. **MATERIALS AND METHODS:** Samples obtained by liver biopsies from 72 cases with chronic hepatitis C were reevaluated with semiquantitation of structural changes regarding "architectural staging" and "necroinflammatory activity." Immunohistochemical reactions were performed with anti-CD34 (QBend), anti-podoplanin (D2-40), anti-smooth muscle actin (1A4) antibodies. The association between immunohistochemical variables, histological criteria and genotype was searched through the Chi-square test. **RESULTS AND DISCUSSION:** The different degrees of structural changes and necroinflammatory activity were well represented in this casuistic (57% cases presenting early forms (F0-F1-F2) and 43% in advanced forms (F3-F4)) and the immunohistochemical reactions accurately delineated sprouts and vessels, allowing the research of association with the histological variables. Regarding genotypes, it is noteworthy that, among all patterns of histological changes, only the presence of steatosis was significantly higher in cases infected with HCV genotype 3. The quantification of vascular markers by immunohistochemistry allowed detecting relevant parallelism between the number of sprouts and blood vessels in each compartment, corroborating previous evidence that demonstrates the morphogenesis of mature

vessels starting from sprouts. These two patterns of portal blood vessels showed progressive increase in their number in parallel to the progression of architectural changes and portal, periportal, and parenchymal necroinflammatory activity, reinforcing the close association between angiogenesis and inflammatory activity in chronic hepatitis C. On the other hand, there was no parallelism between vessel neoformation, markers of fatty disease, and viral genotype. Intriguing observation was the growth in the number of muscularized wall vessels in the portal spaces mainly at late stages of the progression of architectural changes (F3-F4), and future studies should approach the mechanisms relating such changes to the emergence of portal hypertension. The quantification of blood sprouts in the parenchyma was shown to be directly related to that of complete vessels. Such complete vessels in the parenchyma may reflect the capillarization of sinusoids and were associated with the progression of architectural changes, even preceding cirrhosis. We highlight the absence of association of the quantification of sprouts or blood vessels in the parenchyma with the various markers of necroinflammatory activity or fatty disease studied here. Concerning the study of lymphatic vessels, a major subject contribution in the present study, the quantity of sprouts and mature portal lymphatic vessels were highly associated, corroborating, as we had detected with blood vessels, the intimate relationship of sprouts and lymphatic vessels. The increase in the number of both sprouts and portal lymphatic vessels showed direct association with the progression of structural changes, with the degree of portal/septal inflammatory infiltrate and with parenchymal necroinflammatory activity, but not with the degree of periportal/periseptal activity. **CONCLUSIONS:** The identification of sprouts and blood and lymphatic vessels by immunohistochemical methods and their quantification demonstrated the parallelism between the formation of these two classes of vessels, especially in the portal compartment, and the progression of structural changes, neoangiogenesis being detected even before the histological characterization of cirrhosis.

Descriptors: Hepatitis C, chronic; Immunohistochemistry; Blood vessels; Lymphatic vessels; Lymphangiogenesis; Neovascularization, pathologic; Liver; Pathology.

1. INTRODUÇÃO

Os dois grandes temas desta dissertação são: o estudo das alterações vasculares sanguíneas e linfáticas no fígado nas diversas fases (estádios) da hepatite C crônica e secundariamente alguns aspectos da fibrogênese hepática. Para melhor compreendê-los, iniciamos revendo alguns aspectos da anatomia e histologia normal do fígado.

1.1. ASPECTOS DA ANATOMIA VASCULAR DO FÍGADO NORMAL

1.1.1. Vasos sanguíneos

O fígado é a maior glândula do corpo humano e é responsável por manter a homeostasia metabólica, possuindo diversas funções importantes.¹

Sua anatomia consiste em quatro lobos (direito, esquerdo, quadrado e caudado) recebendo sangue arterial da artéria hepática e sangue venoso da veia porta e apresentando sistemas de drenagem venoso e biliar próprios. Dentre suas funções, estão o armazenamento de produtos importantes e de fonte de energia, produção de combustíveis celulares, de proteínas plasmáticas e de fatores de coagulação, produção de ácidos biliares, metabolismo de toxinas e drogas, excreção de ácidos graxos.¹

Localiza-se no quadrante superior direito do abdome, no interior da cavidade peritoneal, abaixo do diafragma e sob a caixa torácica.^{1,2}

O fígado pesa, nos adultos, cerca de 1.400 g a 1.600 g sendo recoberto por uma cápsula fibrosa. Recebe em média 1.500 ml de fluxo sanguíneo por minuto, através do sistema venoso da veia porta (cerca de 60% a 70% do fluxo sanguíneo hepático) que drena o sangue venoso vindo do estômago, pâncreas, baço, intestino delgado e intestino grosso, trazendo assim as substâncias absorvidas na alimentação que serão metabolizadas pelos hepatócitos e também através do sistema arterial da artéria hepática (30% a 40% do fluxo sanguíneo), que leva oxigenação ao fígado e irriga o sistema biliar. Esses dois grandes sistemas vasculares entram no aspecto inferior do fígado através do hilo ou porta hepática. No interior do fígado, os ramos da veia porta, artéria hepática

e ductos biliares seguem em paralelo incluídos nos tratos portais, com ramificação variando entre 17 a 20 ordens.¹

O sangue arterial e venoso chegam separados ao fígado, mantendo-se assim separados ao longo das ramificações dos tratos portais e só vão se misturar nos sinusóides dos lóbulos hepáticos, em sua trajetória que se inicia em zona 1 periportal até zona 3, ao redor da vênula hepática terminal/veia centrilobular. A característica parede fenestrada/descontínua dos sinusóides parcialmente revestidos por células endoteliais permite a íntima comunicação entre o sangue aí circulante e as traves/ placas de hepatócitos. As veias hepáticas centrais (centrolobulares) drenam para a veia supra-hepática, tributária da veia cava inferior, retornando assim à circulação sistêmica.^{1,2}

Os sinusóides possuem papel importante na manutenção das funções do fígado e possuem 4 tipos celulares principais: as células endoteliais sinusoidais, que representam 70% de todas as células, as células de Kupffer, as células estreladas e as células pit, linfócitos com características de células “natural killers”.^{3,4}

Ao contrário das arteríolas, os sinusóides não possuem camada média muscular ou lamela elástica. Através de sua parede fenestrada ocorre a transferência de oxigênio, gás carbônico, água, solutos, substratos, macromoléculas e metabólitos do sangue para os tecidos e vice e versa. Os sinusóides são compostos por uma única camada de células endoteliais apoiados por incompleta membrana basal. As células endoteliais são poligonais distribuídas longitudinalmente ao fluxo sanguíneo. O núcleo das células endoteliais ficam na direção do lúmen e o citoplasma possui poucas organelas. As células endoteliais são presas entre si por zônulas de oclusão que permitem a passagem variável de macromoléculas de acordo com o tipo de vaso e são envolvidas por células de Ito, também conhecidas como “células estreladas” ou pericitos, células mesenquimais que dão suporte estrutural e podem regular o fluxo sanguíneo pois contêm várias formas de miosina. Possuem lâmina basal própria que pode se fundir com a lâmina basal das células endoteliais. Os pericitos podem ser vistos por microscopia eletrônica ou por reações imunohistoquímicas para detecção de actina, especialmente a isoforma α (actina de músculo liso vascular). Os pericitos provavelmente estão envolvidos na síntese

da membrana basal vascular e, por terem miosina, actina e tropomiosina em seu citoplasma possivelmente exercem função contrátil, participando também da fibrogênese perissinusoidal em vários processos patológicos que acometem o fígado.^{5,6}

As células de Kupffer são os macrófagos residentes nos sinusóides hepáticos e ficam intercaladas com as células endoteliais e estão ligadas na barreira endotelial funcionando como sentinela no lúmen.^{5,6}

As chamadas “células pit” são linfócitos granulares grandes com atividade “natural killer”, domiciliadas na luz dos sinusóides, em contato com as células endoteliais e com as células de Kupffer.^{4,5,6}

Entre a parede sinusoidal e a superfície sinusoidal dos hepatócitos, há o espaço de Disse, parcialmente circundado pelos microvilos das membranas na face sinusoidal do hepatócito contendo componentes da matriz extracelular.^{5,6}

O conjunto dessas células forma uma unidade morfológica e funcional, essencial para as funções metabólicas exercidas principalmente pelos hepatócitos, bem como para a resposta imunológica, anti-infecciosa e anti-tumoral que ocorrem no parênquima hepático.⁷

1.1.2. Vasos Linfáticos

Os vasos linfáticos, semelhantes aos capilares sanguíneos quando vistos através de microscopia óptica convencional, estão presentes na maioria dos tecidos, e raramente na medula óssea, sistema nervoso central, cartilagem articular, córnea, unhas e epidermes. Os vasos linfáticos são túbulos de fundo cego e possuem um diâmetro largo no começo e com fechamento no final e anastomosam livremente (comunicações diretas entre vasos).^{5,6}

Os vasos linfáticos têm como função retornar a linfa, o fluido dos espaços intersticiais para o sangue. Diante dos recentes avanços nos estudos do interstício, proposto por Benias et al.⁸ e por Cenaj et al.⁹ como uma rede de canais contendo líquido intersticial interligando os diversos órgãos, com reflexos na resposta inflamatória sistêmica e na disseminação tumoral, pode-se prever para um futuro próximo o crescimento nas pesquisas voltadas para a inter-

relação do interstício e da rede de vasos linfáticos nas diversas condições fisiológicas e patológicas.^{8,9}

Os pequenos vasos linfáticos têm uma lâmina basal incompleta, sem pericitos e sem junções justas, permitindo a passagem de proteínas maiores, restos celulares e microorganismos. Os canais linfáticos possuem numerosas válvulas e são sempre levemente distendidas nestes locais, mostrando ter uma aparência levemente frisada.^{5,6}

Os vasos linfáticos maiores possuem uma camada média muscular que não tem divisão clara em camadas circular e longitudinal. Apresentam maior número de válvulas no interior. Assim como as veias, necessitam de ajuda externa sobre as paredes, portanto a contração rítmica da musculatura lisa da parede das veias linfáticas maiores ajuda a impulsionar a linfa na direção do coração.^{5,6}

1.2. ANGIOGÊNESE

Muitos mecanismos moleculares de angiogênese são comuns ao fígado e a outros órgãos. A angiogênese fisiológica hepática ocorre durante a regeneração do fígado, induzindo a formação de novos sinusóides funcionais enquanto a angiogênese patológica ocorre devido a ativação crônica da cicatrização do tecido e inflamação crônica.^{10,11,12}

Como comumente ocorre nas doenças crônicas do fígado, a hepatite pelo vírus C é caracterizada pela fibrose e inflamação, além da situação particular e potencialmente danosa da formação de estruturas vasculares capilarizadas em substituição aos sinusóides.^{10,11,13}

A angiogênese é um processo de formação de novas estruturas vasculares a partir de uma preexistente ou através de intussuscepção, sendo importante na patogênese das doenças e um potencial alvo terapêutico.^{10,11}

A formação de novos vasos é marcada por diversos eventos: migração de células endoteliais, formação de brotos, proliferação endotelial, junção de brotos e maturação dos vasos.^{10,14,15}

A hipóxia é um dos fatores que levam tanto a angiogênese como a fibrogênese, pois uma grande quantidade de matriz extracelular é sintetizada e

acumulada, e o tecido fibrótico forma resistência ao fluxo sanguíneo e a entrega de oxigênio exigindo que a artéria hepática tenha uma contribuição maior para a formação de sangue sinusoidal.^{10,12,13}

Assim, o fluxo sanguíneo sinusoidal torna-se progressivamente arterializado pressionando os hepatócitos a se ajustar a uma concentração elevada de oxigênio. A capilarização leva a diminuição da difusão do oxigênio dos sinusóides para os hepatócitos levando a regulação da via pró-angiogênicas. A resistência ao fluxo sanguíneo eleva a pressão sanguínea nos vasos portais gerando uma complicação chamada hipertensão portal.^{10,11,13,16}

A angiogênese é estimulada pela hipóxia através da sinalização mediada pelos fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs) e pela inflamação. Os HIFs induzem e aumentam a vasodilatação através da elevação da expressão dos fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) responsável pela modulação e número de fenestras das células endoteliais sinusoidais do fígado com participação do óxido nítrico (regula o fluxo e tonicidade vascular) e as plaquetas e leucócitos como monócitos, macrófagos, plaquetas, mastócitos e outras células do processo inflamatório liberam citocinas que atraem mais células pró-inflamatórias. A formação de novos vasos depende de vários processos de efetores moleculares que são regulados.^{10,11,13,17}

A diminuição e redistribuição de moléculas de adesão levam a perda de contato interendotelial permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas, as quais, juntamente com os componentes da matriz extracelular (ECM) formam uma ponte para a migração das células endoteliais (EC).^{10,11,13}

O aumento dos receptores do fator de crescimento de plaquetas nos sinusóides e células perisinusoidais nas áreas periportais facilita e estabiliza as condições que permitem a proliferação e migração das ECs.^{10,11,17,18,19,20}

O VEGF se liga ao seu receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2) e as células endoteliais abandonam o estado de quiescência para migrarem em direção a fonte de VEGF.^{18,21}

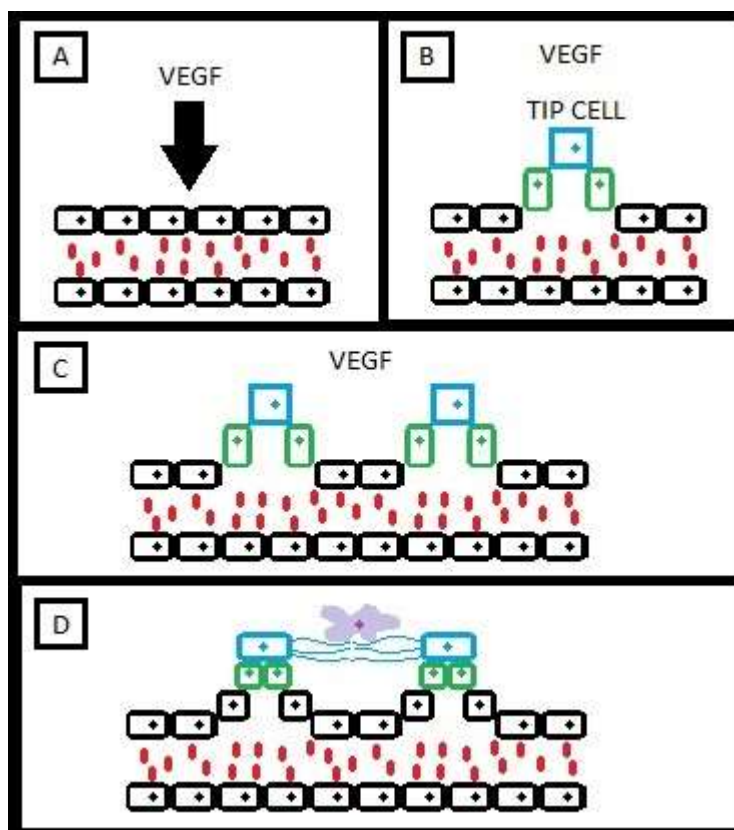
A proliferação de células endoteliais começa a ocorrer em resposta aos fatores de crescimento secretados pelas células endoteliais, pelas células estreladas, células de Kupffer, hepatócitos e leucócitos, participando também do processo outros fatores de crescimento de fibroblastos ácidos e básicos tais

como fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento transformador (TGF).^{10,11,13,18}

As células endoteliais ao se proliferarem passam a formar brotos angiogênicos. Na ponta dos brotos reside a célula da ponta (tip cell) que dirige e guia os vasos em crescimento.²¹

A tip cell é regulada pelo gene Notch e seu ligante. As células do talo (stalk cells) dos brotos se proliferam de forma polarizada e seguem a célula da ponta além de fornecer mais células para a base dos brotos formando uma estrutura alongada (Figura 1).^{18,21}

Para a formação do lúmen, as células endoteliais se ligam umas às outras para que os pericitos e a membrana basal formem um novo vaso com a reconstrução e depósito da matriz extracelular simultaneamente, para posteriormente haver a maturação de novos vasos.^{18,22}



FONTE: Autoria própria

Figura 1 - Esquema do processo angiogênico. A: O fator pró-angiogênico VEGF inicia o processo angiogênico a partir de vasos pré-existentes. B: O broto angiogênico forma-se com a célula da ponta (em azul) e o seu filópode saliente tentando alcançar a origem de VEGF com a ajuda das células do talo que estão se dividindo (em verde). C: Vários

broto angiogênico podem se formar com apenas uma única fonte de VEGF. D: A fusão dos brotos angiogênicos (anastomose) é facilitada por macrófagos (em cor lilás) e resulta na rede vascular completa

As células periendothelias são essenciais para a maturação endotelial dos novos vasos. Durante a "miogênese vascular", as células murais estabilizam os novos vasos inibindo a proliferação endotelial e a migração, e estimulando a produção de matriz extracelular. Proporcionando um controle hemostático e protegendo o novo endotélio dos vasos contra ruptura ou regressão, pois os vasos rompem mais facilmente, se não estiverem revestidos por células musculares lisas.²³

1.2.1. Aspectos da angiogênese relacionada à Hepatite C

O VHC induz a angiogênese por ativação de muitas vias e é considerado um elemento crucial no papel patogênico. Proteínas do core viral, do envelope E3 e as proteínas NS3, NS4 e NS5 desempenham um papel de perturbação nas junções interendothelias e induzem a disfunção mitocondrial, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e levando à produção do fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α).^{10,11,13}

Na capilarização dos sinusóides estão envolvidas alterações fenotípicas das células endotelias, perda de fenestrações e depósitos de membrana basal, além de mudanças nas interações entre célula-célula e célula-matriz nos sinusóides hepáticos. Essas alterações causam complicações com hipertensão portal, insuficiência hepática e inclusive propiciam condições teciduais propícias para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.¹⁵ A produção local de óxido nítrico (NO) resultante de uma super expressão de óxido nítrico induzível pode participar da angiogênese induzindo a vasodilatação. O VEGF e o HGF têm expressão aumentada nas hepatites crônicas, elevando a permeabilidade vascular.^{10,11,13} As células do infiltrado inflamatório, principalmente os macrófagos expressam o fator de crescimento de plaquetas, que favorecem o recrutamento das células estreladas, cujo processo de ativação, caracterizada pela proliferação e transformação em miofibroblastos, leva à expressão citoplasmática de actina do músculo liso alfa e a síntese de colágeno, com a

consequente fibrose, característica importante das doenças crônicas hepáticas.
10,11,19,20,24

Sob o ponto de vista do metabolismo, várias adipoquinas, como reguladoras da fibrogênese, eventos metabólicos e condições inflamatórias, estão envolvidas na progressão da doença e exercem atividade pró angiogênica.
²⁵ Os níveis séricos de leptina são altos na hepatite C e estão envolvidos com o grau de fibrose e angiogênese.^{13,25}

O presente estudo não teve a fibrose como objetivo principal de análise, apenas aborda alguns de seus aspectos essenciais no estadiamento da doença e sua relação com a angiogênese sanguínea e linfática, na mesma linha de estudos recentemente proposta por Guido et al.²⁶ Sob esta abordagem, além da deposição de matriz extracelular rica em colágeno, a fisiopatologia da cirrose é compreendida essencialmente a partir de alterações na microvasculatura e macrovasculatura do fígado, incluindo lesões como a capilarização dos sinusóides, formação de desvios anastomóticos pré e pós sinusoidais e perdas de ramos da veia porta.^{15,26,27}

1.3. LINFANGIOGÊNESE

1.3.1. Aspectos morfológicos e moleculares da formação de vasos linfáticos

O sistema linfático mantém a homeostasia dos tecidos recolhendo o excesso de fluido dos tecidos e devolvendo à circulação sanguínea, proporcionando um ambiente propício para que as células imunes encontrem e respondam aos antígenos nos tecidos linfóides periféricos. Possui papel fundamental na absorção e transporte de lipídios e principalmente no transporte de componentes celulares apoptóticos, antígenos e células apresentadoras de antígenos da periferia para os linfonodos que são cruciais para a imunidade inata e a imunidade adquirida.^{28,29,30,31}

O fator de transcrição prospero homeobox 1 protein (Prox1) é expresso restritamente em uma subpopulação de células endoteliais sanguíneas embrionárias na parede da veia cardinal anterior.³²

As células endoteliais sanguíneas dão origem ao sistema vascular linfático por meio de brotamento e germinação do grande saco linfático jugular. São polarizadas (as células endoteliais fluem juntas ao longo do caminho) na localização inicial e na subsequente migração, sugerindo que haja algum mecanismo de guia envolvido no processo.³² Wigle e Oliver³², em estudo experimental com camundongos “nulos” para Prox1 demonstraram que na falta de Prox1, o brotamento e a germinação são interrompidos e conseqüentemente são desprovidos de sistema linfático. Entretanto a vasculogênese e a angiogênese do sistema vascular sanguíneo não são afetadas, concluindo que o sistema vascular sanguíneo e linfático se desenvolvem de forma independente.

O fator de transcrição Prox1 pode regular o fenótipo de células endoteliais sanguíneas e células endoteliais linfáticas e a expressão elevada de Prox1 induz a mudança de expressão dos genes dos dois tipos de células endoteliais. Na ausência de Prox 1, o fenótipo encontrado foi de células endoteliais sanguíneas e a expressão de Prox1 é o segredo da especificidade no fenótipo das células endoteliais linfáticas. A expressão de Prox1 nas células endoteliais primárias promove a regulação do receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-3 ou Flt4) atuando como um indutor de proliferação celular e fator determinante no destino das células endoteliais linfáticas.^{33,34}

A subpopulação de células endoteliais sanguíneas sai da veia cardinal por brotamento. Essas células brotam após estímulo mediado por Prox1 e se tornam células endoteliais linfáticas, começando a expressar podoplanina e VEGFR-3. A expressão permite a diferenciação molecular das células endoteliais progenitoras da veia cardinal (Prox1+) e células endoteliais linfáticas específicas fora da veia cardinal (Prox1+, podoplanina+, VEGFR-3+). As células endoteliais linfáticas se afastam da veia cardinal dorsalmente e se juntam no tecido mesenquimal para formar uma estrutura capilar na região anterior do embrião. Deste modo as células endoteliais linfáticas específicas podoplanina+ organizam-se numa estrutura semelhante ao saco linfático.³⁵

Estudos imuno-histoquímicos feitos por Ji e Kato ^{36,37,38} relataram que os vasos sanguíneos frequentemente acompanham a rede linfática, mas há diferenças estruturais dos vasos dependendo do tipo de função e tecido.

O estudo de François et al.³⁹ realizado em embrião de rato por meio de tomografia, microscopia confocal e a imagem in vivo permitiu observar as três fases-chaves da morfogênese vascular linfática. Os resultados indicam que o desenvolvimento dos sacos linfáticos iniciais envolvendo a orientação, e o crescimento de agrupamentos (“clusters”) pré-linfáticos de células progenitoras endoteliais linfáticas a partir da veia cardinal, não é o único mecanismo pelo qual a vasculatura linfática é gerada no embrião.

Observou-se naquele estudo que a morfogênese do saco linfático é precedida pelo mecanismo de brotamento mais convencional envolvendo a migração de precursores linfáticos individuais ou grupos para longe das veias cardinais. Entretanto as células linfáticas endoteliais migratórias podem ser capazes de se destacar umas das outras, explorando o seu ambiente até estabelecer ligações umas com as outras em resposta aos estímulos apropriados. Sugerem, assim, aqueles autores que, em contraste com o conceito de angiogênese por brotamento, os vasos linfáticos não crescem apenas pela proliferação brotos linfangiogênicos guiados pela célula da ponta.

Em geral, os vasos linfáticos no pós-neonatal são quiescentes e a linfangiogênese ocorre geralmente em condições patológicas como reparação de tecidos, inflamação, e condições relacionadas com tumores.²⁹ Nossa expectativa é que os recentes avanços no conhecimento da rede de comunicação das estruturas do interstício propulsionem novos experimentos relacionados à linfangiogênese diante dos processos inflamatórios, bem como sua relação com a formação e a disseminação de neoplasias.^{8,9}

1.3.2. Marcadores imuno-histoquímicos de endotélio linfático

Dentre os marcadores universais de endotélio, identificando tanto os de vasos sanguíneos como de linfáticos, destacam-se CD31, CD34, fator de von Willebrand, FLI – 1 e ERG-1.^{40,41,42}

Em muitas ocasiões, os capilares linfáticos são de difícil identificação, ora por se mostrarem colabados, ora porque, estando dilatados, têm parede

delicada, com revestimento endotelial muito similar ao de pequenos vasos sanguíneos, apoiados em delicado tecido conjuntivo.^{28,29,30,31}

Tanto no estudo de doenças inflamatórias como em neoplasias, a discriminação entre vasos sanguíneos e vasos linfáticos tem sido feita por estudos imuno-histoquímicos através de marcadores para vasos linfáticos como VEGFR3/FLT4, LYVE-1, Prox1, podoplanina (D2-40), CCL21, MMR1, desmoplakin e integrina $\alpha 9$.^{32,34,40,41,43,44,45,46}

Dentre os marcadores linfáticos, o que tem se demonstrado como o marcador mais sensível e específico para o endotélio do vaso linfático é a podoplanina⁴⁷, que é, por isto, o marcador selecionado para o presente estudo.

1.3.2.1. Podoplanina – Marcador específico de endotélio linfático

Podoplanina é uma glicoproteína transmembrana que tem a expressão regulada pelo Prox1 e possui papel importante na formação da vasculatura linfática.³⁵

Schacht et al.⁴⁸ verificaram o papel da podoplanina no desenvolvimento vascular e seu efeito na interrupção do gene em camundongos. Aqueles com deleção do gene $T1\alpha$ /podoplanina morreram no nascimento por insuficiência respiratória e defeitos no sistema linfático, caracterizados por diminuição do transporte da linfa, linfedema congênito e dilatação dos vasos linfáticos. Tais alterações independem do desenvolvimento dos vasos sanguíneos, que se mostrou normal. Tal estudo em cultura de células indicou que a podoplanina promove adesão celular, migração e formação do tubo sugerindo que essa glicoproteína é necessária para regular os principais aspectos da formação da vasculatura linfática.

1.3.3. Linfangiogênese hepática

O fígado, sendo um órgão altamente vascularizado, com amplo sistema de sinusóides e espaços perivasculares que propiciam grandes trocas de relevância metabólica para todo o organismo, tem importante participação no

sistema linfático, produzindo de 25 a 50% do total da linfa recebida pelo ducto torácico.^{43,53}

Um dos pioneiros no estudo do sistema linfático do fígado foi Mall⁴⁹, que, em 1901 realizou experimento, injetando gelatina colorida na veia porta de um coelho e verificou que a gelatina percorreu primeiramente no espaço perisinusoidal (espaço de Disse). Depois alcançou o espaço perilobular, que ficou conhecido como “espaço do Mall”, e finalmente entrou nos vasos linfáticos portais. Mall concluiu que os linfáticos do fígado provêm dos espaços linfáticos perilobulares e que estes se comunicam diretamente com os espaços linfáticos perivasculares. A linfa atinge aqueles espaços por um processo de filtração através de aberturas que estão normalmente presentes nas paredes dos sinusóides hepáticos. Os linfáticos maiores que acompanham a veia porta, surgem entre os lóbulos próximos das suas bases, enquanto os linfáticos que acompanham a veia hepática não surgem dentro do lóbulo, mas em torno das veias sublobulares maiores.

A reconstrução tridimensional dos linfáticos intrahepáticos feita por meio de microscopia eletrônica por Yamamoto e Phillips⁵⁰ demonstra que os linfáticos formam muitas redes ao redor dos vasos portais e do ducto biliar. Os linfáticos são compostos principalmente de vasos retos e anastomose de ramos laterais curtos. A bifurcação dos trajetos portais mostrou-se especialmente rica em anastomoses. Ocasionalmente foram observadas oclusões sugerindo a existência de válvulas. Os linfáticos retos seguem paralelos ao trato portal e os ramos laterais se comunicam com os retos, cujo número varia conforme o tamanho do trato portal.

O sistema linfático hepático é dividido em componente profundo e superficial/subcapsular. A fração profunda coleta a linfa a partir os espaços perivasculares intralobulares fazendo trajeto desde as regiões centrilobulares (zona 3) até os tratos portais. Já o componente superficial, subcapsular recolhe a linfa das partes convexa e inferior do fígado. Esses dois componentes drenam para os linfonodos hepáticos/celíacos.^{28,29,30,51,52}

A linfa hepática contém 80% das proteínas presentes no plasma. As proteínas são filtradas através das fenestras dos sinusóides e vão para o espaço de Disse. Como não há evidências de capilares linfáticos no interior dos lóbulos,

o fluido oriundo dos espaços de Disse fluem em sentido aos espaços-porta devido a diferença da pressão hidrostática entre a veia porta ou capilares arteriais e o espaço intersticial. Na região de placa limitante, a linfa flui através de espaços entre os hepatócitos da placa limitante (espaços pré-linfáticos ou espaços de Mall) drenando para os capilares linfáticos situados nos espaços porta.^{9,28,29,30,31,53} Os estudos iniciais de Cenaj et al.⁹ parecem promissores na demonstração da interação do interstício com os linfáticos, gerando a expectativa de maiores esclarecimentos acerca do papel das estruturas desta transição em condições fisiológicas e patológicas.

Os capilares linfáticos possuem paredes finas compostas de uma única camada de células endoteliais linfáticas (LEC). Possuem membrana basal incompleta ou ausente e são recobertos por pericitos ou células murais.⁵³

Os capilares linfáticos se juntam em vasos coletores, revestidos pelas células endoteliais linfáticas que se apoiam em tecido conjuntivo com células musculares lisas e membrana basal, os linfáticos coletores, que drenam o fluido para os linfonodos no hilo hepático, para os quais também conflui a linfa oriunda do componente periférico/subcapsular. Ainda que menos relevante, existe também um terceiro componente de vasos linfáticos que drenam fluido no sentido inverso, acompanhando o trajeto das veias centrilobulares para as veias hepáticas e convergem para grandes vasos linfáticos que atravessam ao longo da veia cava inferior através do diafragma em direção aos linfonodos.^{28,29,53}

O citoesqueleto endotelial linfático é ligado a matriz extracelular adjacente por meio de filamentos ancorados compostos de fios finos de fibras elásticas altamente permeáveis. O citoesqueleto possui junções descontínuas “tipo botão” e válvulas nas bordas por onde passa o fluido intersticial, macromoléculas e células imunitárias.²⁹

A escassez de trabalhos envolvendo o comportamento do sistema linfático no fígado e o mecanismo da linfangiogênese nas hepatites crônicas, especialmente nas etapas que precedem a cirrose é, assim, mais uma motivação para a realização do presente estudo.

1.4. HEPATITE C

As hepatites virais são problemas relevantes de Saúde Pública. Dentre elas, destaca-se aquela causada pelo vírus da hepatite C (VHC) que segundo dados de 2015 da Organização Mundial de Saúde (OMS), é encontrada em 71 milhões de pessoas no mundo, sendo cerca de 1,75 milhões de novos casos por ano.⁵⁴ Só em 2013, estima-se que 700.000 pessoas morreram de hepatite C no mundo. Países da região do mediterrâneo oriental e região europeia possuem maiores taxas de prevalência. No Brasil, entre os anos de 2005 a 2009, um estudo transversal estimou que cerca de 1,3 milhões de brasileiros estejam infectadas com o vírus, representando em torno de 1,38% da população, havendo maior taxa de prevalência nas regiões sudeste e sul, destacando os estados de São Paulo e Rio Grande do Sul respectivamente.^{54,55,56,57,58,59,60,61}

A transmissão ocorre por contato com o sangue, sendo que o modo de transmissão mais comum é o uso de drogas. Outros meios de transmissão são a infecção perinatal, a sexual e o uso ou contato com materiais contaminados, caso dos profissionais da saúde, ou no caso de colocação de piercings e tatuagens ou procedimentos dentários e cirúrgicos.^{54,57}

A hepatite C pode se manifestar usualmente entre 2 a 12 semanas após a exposição.^{57,62}

Clinicamente, a infecção pelo vírus da hepatite C pode ocorrer de forma assintomática (85% dos casos) ou com sintomas leves na fase aguda ou na fase crônica, com pouca ou nenhuma alteração dos níveis séricos das enzimas hepáticas.⁶³

Mesmo silenciosamente, o desenvolvimento da forma crônica pode progredir para fases avançadas como a cirrose e o carcinoma hepatocelular (CHC), gerando altos custos de tratamento, comprometendo a qualidade de vida do paciente e até mesmo levar a óbito. Por esta razão, é uma das indicações mais frequentes para o transplante hepático.^{56,57,60,64,65,66}

Se a doença for diagnosticada na fase aguda, há chance de ocorrer uma resposta virológica sustentada (RVS) ou cura espontânea. Salientam-se os relatos de que pacientes com hepatite C aguda sintomáticos desenvolvem infecção crônica entre 48 a 75% dos casos enquanto persiste a estimativa de

que 85 a 90 % dos pacientes assintomáticos evoluam para a cronificação e que 10 a 20% evoluam para cirrose em um período de 20 a 30 anos.^{62,63,67,68}

1.4.1. Hepatite C Crônica

O estado de infecção crônica é marcado pela presença de anticorpos séricos anti-VHC e da persistência do ácido ribonucleico (RNA) do vírus no sangue por mais de 6 meses após o início da infecção aguda. Nem sempre é possível ter precisão sobre o início da doença, portanto o exame anátomo-patológico é parâmetro de grande importância para o diagnóstico das lesões hepáticas que efetivamente caracterizem hepatite crônica, seus graus de atividade necro-inflamatória e o estadiamento do dano estrutural.⁶⁹

A hepatite C crônica pode evoluir por anos de forma lenta variando clinicamente entre a forma assintomática, a forma ativa com fibrose progressiva, cirrose, e até mesmo o carcinoma hepatocelular. Além da diversidade genotípica do VHC, da carga viral e da fonte de infecção, fatores do hospedeiro como o desequilíbrio entre as respostas dos linfócitos TCD4 Th1 e TCD4 Th2 podem estar implicados na capacidade de erradicação do vírus.^{60,63,69,70,71}

Do ponto de vista clínico, a infecção crônica é bastante complexa, por possuir múltiplas fases evolutivas que, sob o ponto de vista anátomo-patológico, são representados por diversos graus de inflamação, necrose e dano hepático, resultando em diferentes prognósticos.^{57,69}

Quando a hepatite crônica evolui para fase cirrótica, nota-se nessa progressão um conjunto de alterações micro e macroscópicas na estrutura e funcionamento do fígado. Destacam-se alterações fundamentais na fisiopatologia que estão relacionadas à progressão da doença como, por exemplo, as lesões (capilarização de sinusóides, formação dos desvios anastomóticos pré e pós-sinusoidais e a trombose em ramos da veia porta). A capilarização dos sinusóides pode ainda ser apontada como essencial para a identificação do início da formação de neoplasia, principalmente o CHC, já que, diferente do fígado normal e das etapas iniciais da cirrose, este possui vascularização predominantemente arterial.^{15,72,73,74}

1.4.2. Diagnóstico

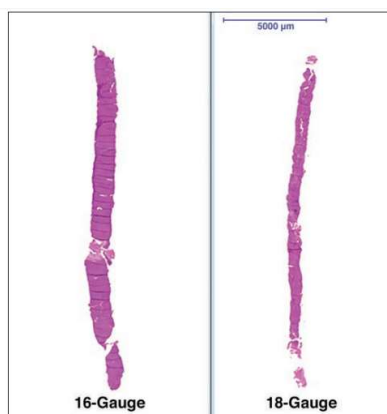
Atualmente, o diagnóstico baseado nos estudos sorológicos e virológicos moleculares, incluindo a genotipagem, acompanhados de avaliação da rigidez hepática por métodos como o fibroscan, ultrassonografia ou ressonância magnética nuclear é suficiente para, no adequado contexto clínico-epidemiológico, indicar o tratamento com os antivirais de ação direta (DAA) com respostas virais sustentadas superando 95% dos casos.^{75,76} Mesmo assim, devido a comorbidades e variabilidade individual, em vários casos faz-se necessária a realização de mais exames para a detecção do grau de acometimento hepático e eventuais alterações progressivas ou regressivas tanto do dano estrutural como da atividade necro-inflamatória, além da avaliação de características pré-neoplásicas ou neoplásicas em nódulos que, pelos métodos de imagem, mostrem-se maiores ou de cor ou textura diferente dos demais.^{57,69,77}

A avaliação morfológica traz, ainda, relevantes informações em doenças hepáticas crônicas e pode contribuir para a melhor compreensão da patogenia e até selecionar biomarcadores potencialmente capazes de prever aspectos relacionados a resposta terapêutica e sugerir o prognóstico de progressão da infecção. Quando possível, a comparação de séries de amostras obtidas por biópsias, permite a compreensão das diversas formas evolutivas das hepatites.

Especialmente no contexto de estudos acadêmicos como esta dissertação, visando à análise da possível interação entre os diversos aspectos da patogênese das lesões, os exames histopatológicos e imuno-histoquímicos de amostras obtidas por biópsia hepática persistem como essenciais.

A amostra hepática deve ser cilíndrica e longa, fornecendo maior precisão diagnóstica em amostras com mais de 1,5 cm, com pelo menos 10 espaços-porta representados. Um estudo do professor Luiz Carlos Gayotto, com 1.873 biópsias hepáticas, demonstrou que o diagnóstico conclusivo abrangia os fragmentos maiores que 1,0 cm e não fragmentados, enquanto o diagnóstico sugestivo ou inconclusivo era mais frequentemente obtido pela análise de espécimes fragmentadas menores do que 0,5 cm de comprimento.⁶⁹

O estudo de Colloredo et al.⁷⁸, chama a atenção para o quanto a confiabilidade da amostra é afetada pelo tamanho nas hepatites virais crônicas. Tal pesquisa constatou que quanto menor o comprimento da amostra, maior a taxa de lesões de baixo grau e o quase desaparecimento dos casos com lesões de graus mais altos. Também observou-se que a redução no diâmetro da amostra produziu um número menor de tratos portais completos, independente do comprimento da amostra. Estudos recentes também tem afirmado a importância da qualidade da amostra com relação a obtenção de amostras com tamanho e calibre suficiente, para evitar que tanto o grau como o estágio seja subestimado. Recente consenso publicado pela Associação americana para o estudo de doenças do fígado (AASLD) recomendou recentemente que para o diagnóstico, graduação e estadiamento da doença hepática difusa não neoplásica, a biópsia deve ser colhida com agulha de calibre 16 e ter pelo menos 2 a 3 cm de comprimento apresentando pelo menos 11 tratos portais completos. Agulhas mais finas, de calibre 18, colhem amostra de 1 a 2 cm e são utilizadas para biópsia de lesões hepáticas focais ou neoplásicas devido a preocupação com a hemorragia de neoplasias hepáticas neovascularizadas (Figura 2).



FONTE: Tublin ME, et al., 2018.

Figura 2 - Fotomicrografia mostram amostras de biópsia de fígado obtidas usando agulhas de calibre 16 (esquerda) e calibre 18 (direita)

A experiência internacional mostra que tendo a amostra o comprimento e/ou a largura menores, há clara tendência a subestimação do grau e estágio da doença hepática, sendo que tal questão pode interferir na indicação terapêutica

adequada.^{69,77,79} Como veremos adiante, as biópsias realizadas na casuística do presente estudo usaram agulhas de calibre 16.

Apesar de amostras cirúrgicas feitas com pinças ou em cunha coletarem uma quantidade de material um pouco maior, são contra indicadas, pois geram amostras subcapsulares, onde os espaços porta costumam ser naturalmente maiores, acarretando na hipervalorização do grau de fibrose hepática.⁶⁹

O processo de avaliação morfológica pode ser aprofundado no plano molecular pelas técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) que utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais contra os antígenos virais e outros direcionados a cada tipo celular do próprio fígado e da resposta inflamatória.⁸⁰

Amostras de tecido colhidas por biópsia podem ainda ser submetidas a exames de hibridização *in situ*, que permitem a identificação de sequências específicas do RNA do VHC nos diversos componentes do tecido hepático.⁸¹

Atualmente, o desenvolvimento dos estudos de genética molecular renovou o interesse na pesquisa de antígenos no tecido. Além de trabalhos antigos de IHQ envolvendo a detecção dos antígenos virais que conseguiram localizar componentes do VHC utilizando anticorpos produzidos *in house*, como o de Nouri-Aria et al.⁸² e Nayak e Sathar⁸⁰, que relatavam baixa especificidade e sensibilidade, há relatos de anticorpos contra diversos produtos específicos de cada região gênica do vírus da hepatite C. Ainda que as tentativas de padronização para uso na rotina diagnóstica não tenham sido bem sucedidas em vários centros, inclusive em nosso laboratório no LIM-14-HC-FMUSP, fica, ainda hoje, a expectativa do desenvolvimento de novos esforços para sua padronização em amostras de biópsia de casos clinicamente relevantes, com potencial de maior conhecimento da biopatologia da hepatite C e eventual contribuição na compreensão dos mecanismos de ação e resistência aos antivirais de ação direta cujo uso nos últimos anos revolucionou o tratamento de pacientes portadores do VHC.^{67,81,83,84}

Merece especial atenção a possibilidade oferecida pela imuno-histoquímica de detecção de moléculas que permitam estudos de interesse da patogênese das lesões, como alguns importantes aspectos acerca da angiogênese sanguínea e linfática, motivos de análise na presente dissertação.

1.4.3. Genótipos do Vírus da Hepatite C

Além da grande variação das fontes de infecção do vírus da hepatite C e da resultante diversidade de cargas virais que cada paciente recebe, a diversidade genética dentre os vírus da hepatite C detectados nos diversos países é identificada pela caracterização dos genótipos virais, sendo bem reconhecidos 7 genótipos que diferem entre si através da sequência de nucleotídeos (31 a 34%) e também através da sequência de aminoácidos (30%).^{85,86}

No Brasil, foram encontrados 5 genótipos: 1, 2, 3, 4 e 5. Os genótipos mais prevalentes são o tipo 1 (50 a 78%) e tipo 3 (11 a 43%) cuja proporção varia de acordo com a região geográfica. O genótipo tipo 2 é pouco prevalente (1 a 11%) enquanto os genótipos tipo 4 e 5 são raramente encontrados (<1%).^{87,88,89}

Segundo estudos realizados entre os doadores de sangue de São Paulo, houve predominância dos subtipos: 1a corresponde com 32 a 34,4% da totalidade, enquanto 1b foi detectado entre 36,2% a 45,5% e 3a entre 18% a 24,2%. Os genótipos 4 e 5 foram raramente detectados.^{90,91}

Sendo os genótipos 1 e 3 e seus subtipos os mais prevalentes tanto no Brasil como em São Paulo, o estudo desta dissertação focará principalmente em casos de pacientes infectados por um desses dois genótipos.

1.4.4. Histopatologia das Hepatites

Apesar do vocábulo “hepatite”, sob o ponto de vista semântico, abranger todas as inflamações que, direta ou indiretamente acometem o fígado, o conceito histopatológico de hepatite inclui um conjunto de lesões necróticas e inflamatórias que acometem o fígado de modo difuso, embora com distribuição heterogênea.⁹²

De modo geral, nas hepatites agudas, as lesões são mais intensas no parênquima, afetando os hepatócitos de modo mais exuberante, sede principal das infecções pelo vírus C. Nas hepatites crônicas, predomina a inflamação portal e a atividade necro-inflamatória de interface (periportal), apesar das lesões

parenquimatosas também estarem presentes em graus variados, geralmente bem menos acentuadas que nas formas agudas.^{77,92}

Ainda que o estudo da histopatologia seja baseado em padrões, os dados não são de todo objetivos, pois dependem de variações intra e inter-observador e também da heterogeneidade da distribuição das lesões, sendo importante salientar que a amostra obtida mediante punção por agulha representa apenas cerca de 1/100.000 do fígado.⁹³ Em busca de uniformização das interpretações, foram apresentadas diversas classificações histopatológicas das hepatites crônicas. Mesmo que cada classificação tenha aspectos peculiares, em seu conjunto, todas as classificações, além dos critérios estritamente definidores do diagnóstico, propõem categorizar os seguintes aspectos⁶⁹:

a. estadiamento, ou seja, o quanto da estrutura lobular já foi comprometida.

b. atividade, ou seja, a graduação da necro-inflamação, habitualmente detalhada quanto à atividade das lesões portais, peri-portais e parenquimatosas ou lobulares. Os sistemas de semi-quantificação são variados, sendo mais habituais aqueles em que cada variável é semi-quantificada de 0 a 4. Como veremos adiante, no presente estudo os critérios de cada tipo de alteração foram analisados individualmente e, as avaliações por categoria de lesão seguiram a recomendação das Sociedades Brasileiras de Patologia e de Hepatologia (SBP+SBH), conforme publicação de Gayotto et al.⁹³

1.4.4.1. Peculiaridades da histopatologia da Hepatite C

Aspectos histopatológicos mais habitualmente encontrados nas infecções pelo VHC incluem infiltrado linfo-histiocitário, intralobular e porta maiores que os das demais hepatites virais, principalmente a Hepatite B, sendo também mais exuberante a hipertrofia e a hiperplasia das células sinusoidais e de Kupffer. Desde antes do descobrimento do próprio VHC, as então chamadas “hepatites crônicas não A-não B” já eram reconhecidas histologicamente pela maior frequência de agregados linfóides portais, não raramente dando origem a folículos linfóides, com centros germinativos variavelmente desenvolvidos.

Diferente das hepatites por outros vírus, a hepatite C costuma apresentar frequentemente “lesões ductais do tipo hepatítico”, em grau consideravelmente inferior ao que se encontra nas verdadeiras colangites. Também merece destaque a presença de graus variados de esteatose mais relatada em associação ao genótipo 3 do VHC. Tal achado requer estudo mais detalhado, até porque muitos portadores crônicos do VHC apresentam esteatose ou mesmo esteato-hepatite como comorbidade nos tempos atuais em que a síndrome metabólica assume caráter epidêmico em muitos países, inclusive no Brasil.^{92,94}

Em síntese, vemos que, mesmo com a introdução dos medicamentos antivirais com ação direta (DAAs), com taxas de resposta viral sustentada superiores a 90%, a hepatite C, especialmente em suas formas já avançadas, permanece como importante desafio à Saúde Pública, persistindo como a primeira causa de indicação de transplantes hepáticos. Como recentemente destacaram Rivas-Estilla e Lozano-Sepulveda⁹⁵, as pesquisas são ainda necessárias em diversos aspectos, como a análise de aspectos da patogênese da hepatite C tanto para o melhor conhecimento dos modos de progressão, bem como da regressão de importantes lesões como a inflamação, a fibrogênese e a angiogênese, além de sua interação com fatores de comorbidades, como a esteatose e a esteato-hepatite. Alguns desses aspectos serão motivo de estudo na presente dissertação.

2. OBJETIVOS

1. Analisar os principais aspectos histológicos de lesão hepática nos pacientes soropositivos para Hepatite C valorizando, quando presentes, os aspectos relacionados à comorbidade com a doença gordurosa.
2. Caracterizar eventuais diferenças entre os aspectos histológicos de lesão hepática nos conjuntos de pacientes infectados pelo genótipo 1 ou pelo genótipo 3.
3. Analisar de modo quantitativo, por imuno-histoquímica, aspectos de padrões de vascularização sanguínea em comparação com os achados histopatológicos, especialmente com o estadiamento dos danos arquiteturais, refletindo os padrões de fibrose.
4. Analisar a vascularização linfática por imuno-histoquímica e compará-la com aspectos histológicos de lesão hepática atribuíveis ao VHC e à doença gordurosa.

3. METODOLOGIA

3.1. CASUÍSTICA

O universo do presente estudo inclui 190 casos de pacientes caracterizados mediante exames sorológicos, moleculares e pela histopatologia, que foram atendidos nos ambulatórios de Gastroenterologia e de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período de 2000 a 2015 (Figura 3).



FONTE: Autoria própria

Figura 3 - Distribuição do universo de casos

A seleção das amostras utilizadas no trabalho foi baseada nos seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- 1- Diagnóstico de infecção pelo vírus da Hepatite C previamente estabelecido por métodos sorológicos e virológicos;
- 2- Disponibilidade de amostras anatomopatológicas colhidas por biópsia por agulha;

Critérios de exclusão:

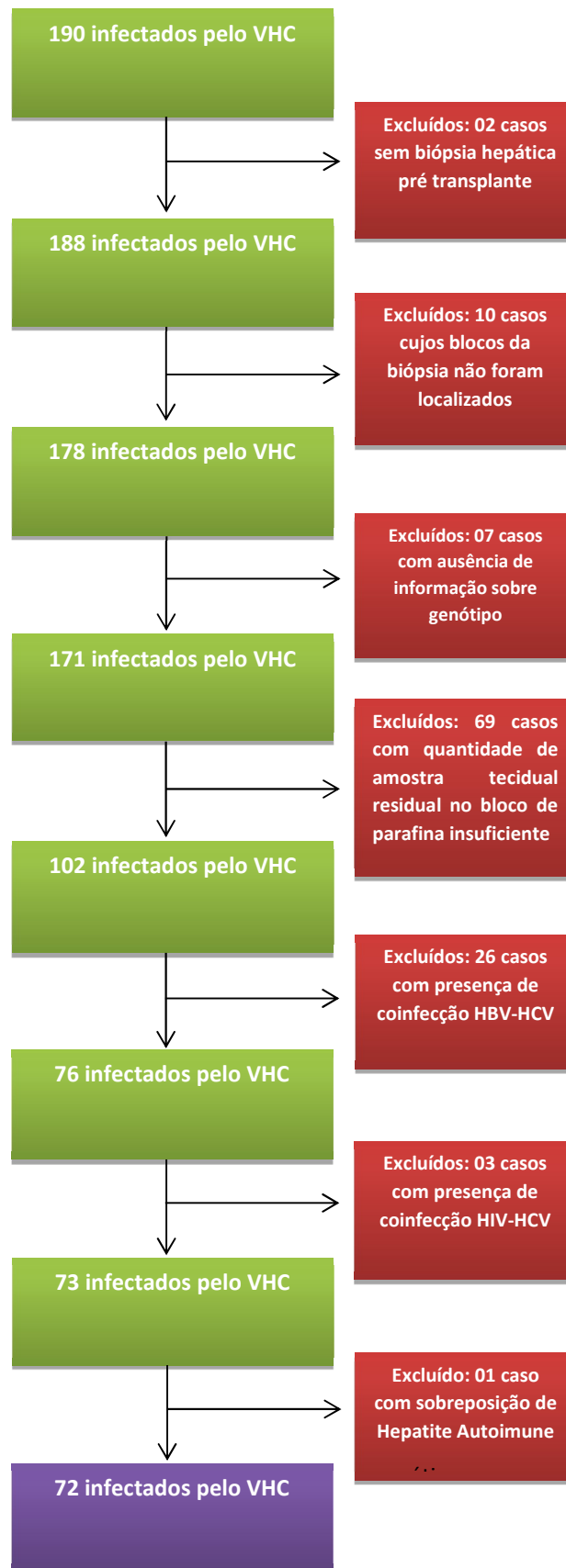
- 1- Dados clínicos mínimos inconsistentes;
- 2- Ausência de informações sobre genótipo;
- 3- Quantidade de amostra tecidual residual no bloco de parafina insuficiente para os novos estudos histopatológicos e imuno-histoquímicos planejados para este estudo, definindo-se como mínimo comprimento do tecido 1 centímetro e/ou a identificação de pelo menos 10 espaços portas;
- 4- Presença de coinfeção VHB-VHC;
- 5- Presença de coinfeção VIH-VHC;

O estudo utilizou amostras hepáticas obtidas dos arquivos da Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do HC-FMUSP cuja análise é retrospectiva com sigilo dos dados pessoais, em nada interferindo em condutas terapêuticas. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HC em 24/11/2016 com número de registro on-line 15847 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Plataforma Brasil em 19/01/2017 com número de registro on-line 1894357

A revisão dos dados individuais de cada paciente foi realizada através de consultas ao prontuário eletrônico (HC-MED e SIGH).

3.2. FLUXOGRAMA DA SELEÇÃO DE CASOS

A partir do universo total, seguindo critérios de exclusão, observamos que dentre os 190 casos, 02 casos somente contavam com biópsia pós-transplante, 10 casos não dispunham mais de tecido residual nos arquivos do DAP, 07 casos não possuíam informações sobre genótipo no prontuário, 69 casos apresentavam quantidade de amostra tecidual residual no bloco de parafina insuficiente, 26 casos apresentavam evidências de coinfeção VHB-HCV, 03 casos apresentavam evidências de coinfeção VIH-HCV e 01 caso apresentava síndrome de sobreposição com hepatite autoimune (Figura 4). Portanto, a população final para este estudo consiste em 72 amostras.



FONTE: Autoria própria

Figura 4 - Fluxograma de casos de Hepatite C incluídos no estudo

Os dados de identificação das amostras, gênero, data de nascimento, dados moleculares e dados bioquímicos da rotina diagnóstica dos casos selecionados, estão expostos no Anexo NNNNN, OOOOO e PPPPP.

Vinte nove pacientes são do sexo masculino (40%) e quarenta e três do sexo feminino (60%), com idade média de 48,7 anos, compreendendo a faixa de 22 a 78 anos.

A sorologia para detecção de anticorpos anti-VHC foi utilizada como confirmação diagnóstica para hepatite C. Dentre os 72 casos selecionados, em 43 (60%) havia, no prontuário, informes sobre o exame sorológico, o qual não foi relatado nos demais 29 casos (40%).

Nos casos em que os exames sorológicos para anticorpos anti-VHC não constavam no prontuário, adotamos o resultado do exame molecular para detecção da quantidade da carga viral através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a confirmação diagnóstica para hepatite C.

Dos 29 casos que não possuíam informe sobre o exame sorológico, 27 casos (93%) possuíam resultado positivo do exame de PCR para detecção do RNA do VHC, 2 casos possuíam resultado com valor abaixo do limite de detecção (7%) mas como havia informe quanto ao genótipo, os casos foram incluídos para o estudo.

3.3. BIÓPSIA HEPÁTICA

As amostras hepáticas colhidos por biópsia por agulha calibre 16 foram fixadas em solução de formol salino tamponado a 4% com pH 7,4.

O processamento histológico efetuado por ocasião do diagnóstico seguiu o processo convencional de desidratações progressivas em álcoois e diafanização em banhos de xilóis à temperatura ambiente.

O material foi embebido e embocado em parafina a 60-62°C e submetido a microtomia com navalhas descartáveis em micrótomo rotativo manual gerando cortes histológicos com 3 µm de espessura tanto em lâmina

sem tratamento químico como também em lâmina com tratamento químico com silano.

Os cortes foram desparafinados em estufa a 60°C, seguindo-se as colorações para Hematoxilina-eosina (H.E.), picrosirius vermelho, tricrômico de Masson e impregnação de fibras reticulínicas pela prata.

Especificamente para o presente estudo, todas as amostras parafinadas dos 72 casos selecionados tiveram seus blocos novamente submetidos a microtomia para obtenção de cortes para nova coloração de Hematoxilina-eosina e picrosirius vermelho realizada no Laboratório de Investigação Médica em Patologia Hepática 14 (LIM 14) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.4. ANÁLISE DOS CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS DE LESÃO HEPÁTICA

As lâminas dos 72 casos coradas com Hematoxilina-eosina e Picrosirius Red foram submetidas à análise histopatológica conjunta por 2 patologistas, o orientador desta tese e a Doutora Ana Paula Farina Pasinato.

Os seguintes critérios foram analisados:

- Aspectos ligados ao “estadiamento”, significando alterações estruturais.

- Alterações de natureza necro-inflamatória oferecendo uma “graduação da atividade” das lesões.

As alterações histológicas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, atribuindo-se um valor para cada critério estudado, em consonância com a proposta por Gayotto et al.⁹³ na classificação da Sociedade Brasileira de Patologia, conforme explicitado na tabela S.

Para avaliar possível comorbidade com síndrome metabólica ou eventuais alterações peculiares atribuíveis a infecções por diferentes tipos do VHC, acrescentamos critérios histológicos relacionados a doença gordurosa do fígado conforme propostas por Kleiner et al.⁹⁶ valorizadas no diagnóstico da

Esteato-hepatite (esteatose, balonização e presença ou não de Esteato-hepatite associada) (Tabela T), além da classificação das fibroses perivenular e pericelular aqui definidas como 0= ausente, 1= presente, pouco exuberante ou 2= acentuada.

Os critérios inclassificáveis em determinada amostra receberam o score 99.

Estadiamento – Alteração estrutural

0 – Nenhum dano significativo à estrutura lobular

1 – Expansão fibrosa de espaços-portas

2 - Expansão portal com septos porta-porta

3 – Preservação apenas parcial da estrutura lobular, com septos porta-porta e porta-centro com esboços nodulares, geralmente incompletos

4 – Cirrose, plenamente identificada ou predomínio de áreas nodulares em relação a lóbulos remanescentes

Seguindo recomendação de Wanless et al.⁹⁷ (“classificação Laennec”) as cirroses foram adicionalmente subclassificadas em:

4A - nódulos completos geralmente grandes, dissociados por finos septos fibrovasculares

4B - nódulos completos de diâmetro variável, dissociados por septos fibrovasculares de espessura variada

4C - nódulos completos menores, dissociados por septos fibrovasculares predominantemente espessos.

Infiltrado inflamatório portal/septal

0 - Raros linfócitos portais

1 - Aumento discreto do número de linfócitos portais

2 - Aumento moderado do número de linfócitos portais

3 - Aumento acentuado do número de linfócitos portais

4 - Aumento muito acentuado do número de linfócitos portais

Atividade periportal/peri-septal

0 - Ausência de lesões da interface espaço porta/parênquima

1 - Extravasamento de linfócitos para a interface (spill-over), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados

2 - Necrose em saca-bocados discreta (pequenas áreas em poucos espaços-porta)

3 - Necrose em saca-bocados moderada (extensas áreas em poucos espaços-porta ou pequenos focos em muitos espaços-porta)

4 - Necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços-porta

Atividade Inflamatória no Parênquima

0 - Hepatócitos normais, não havendo infiltrado leucocitário nos lóbulos

1 - Alterações discreta de hepatócitos, incluindo tumefação ou retração acidofílica, além de discreto infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose

2 - Necrose focal de hepatócitos circundado por agregados linfo-histiocitário em numerosos sítios

3 - Necrose focal de hepatócitos, com significativo infiltrado linfo-histiocitário em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente

4 - Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios, associada a necrose confluyente extensa/múltipla

Esteatose (gradação e porcentagem estimada)

- 0 – Ausente ou até 5% de hepatócitos com esteatose
- 1 – Poucos hepatócitos com esteatose (até cerca de 30%)
- 2 – Quantidade moderada de hepatócitos com esteatose (40%-60%)
- 3 – Quantidade elevada de hepatócitos com esteatose (70% - 100%)

Balonização

- 0 - Ausente
- 1 - Leve
- 2 - Moderada a acentuada

Esteato-hepatite

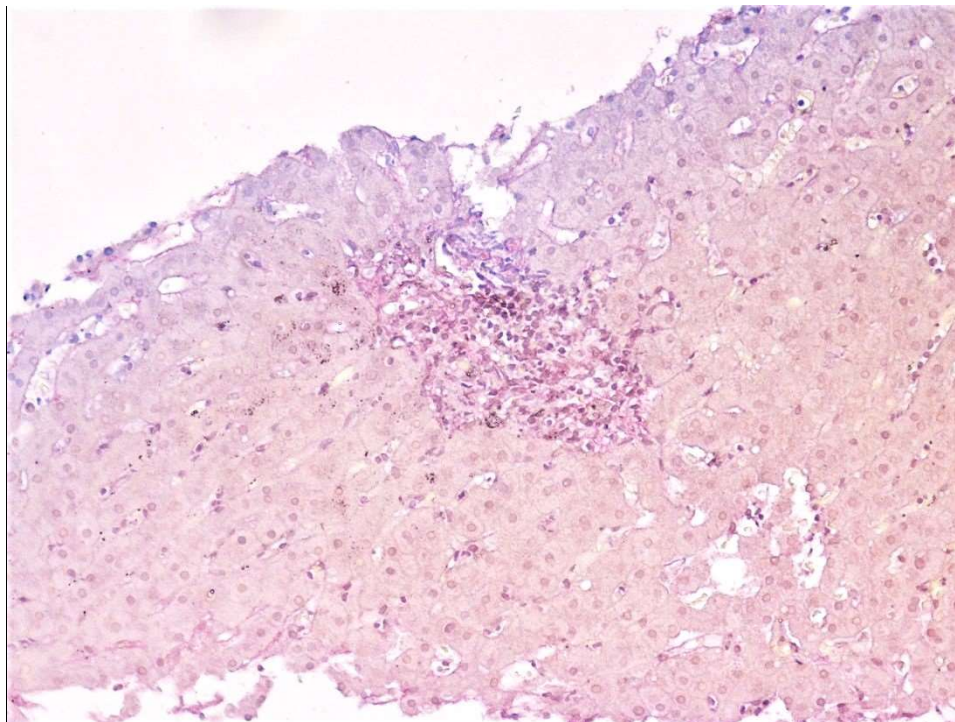
- 0 – Ausente
- 1 – Presente

Fibrose Pericelular

- 0 - Ausente
- 1 - Presente, pouco exuberante
- 2 – Acentuada

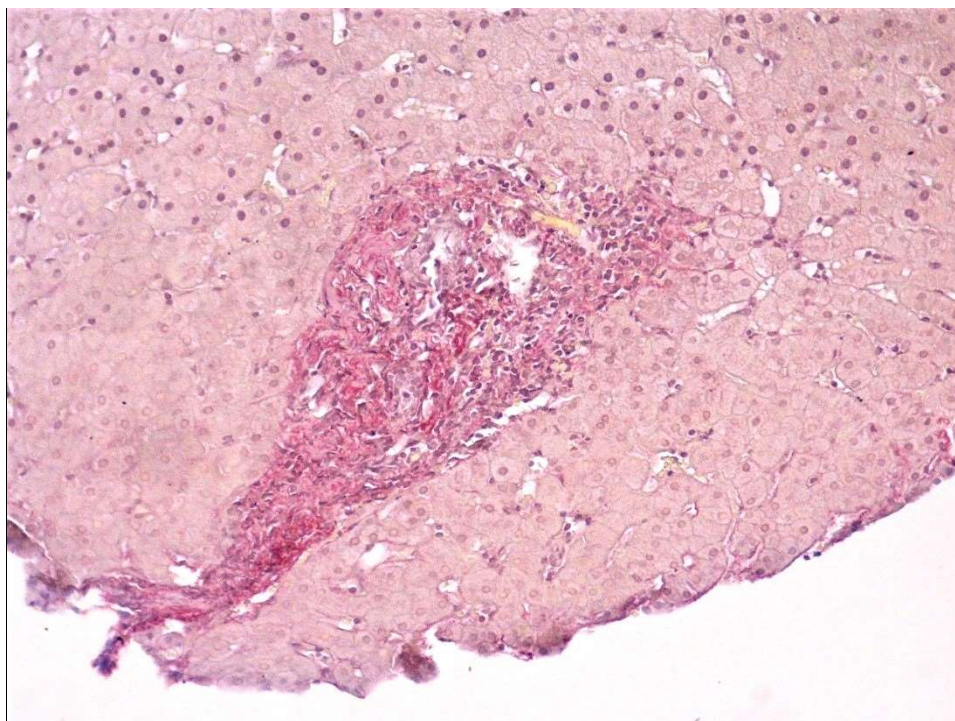
Fibrose Perivenular

- 0 - Ausente
- 1 - Presente, pouco exuberante
- 2 - Acentuada



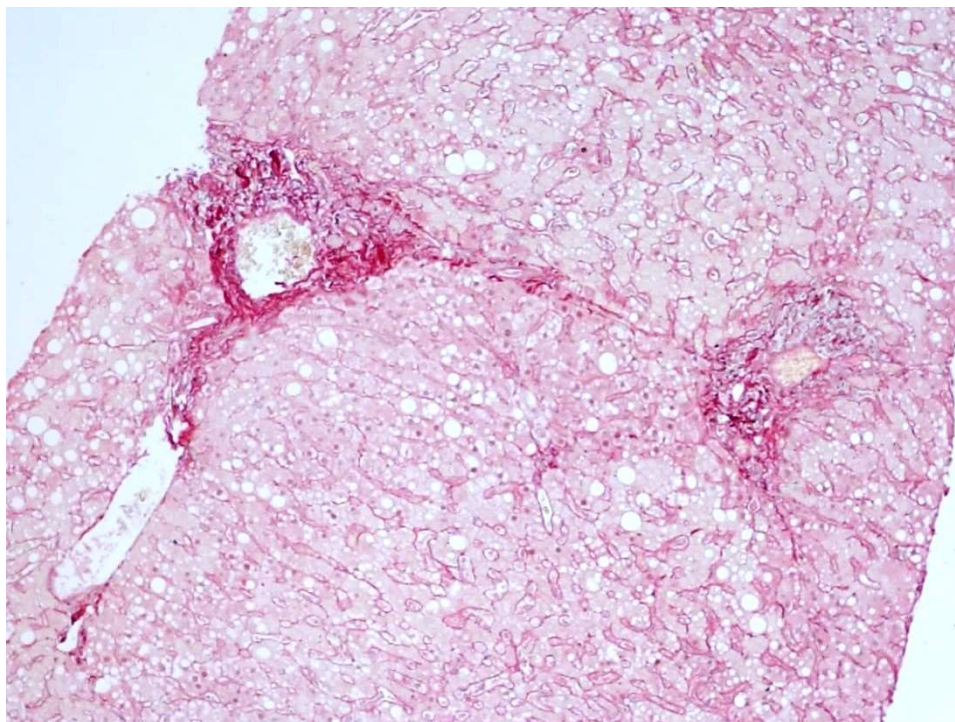
FONTE: Autoria própria

Figura 5 - Alterações histológicas mínimas com arquitetura preservada e discreta inflamação portal. (Caso 38, Picosírius, x200)



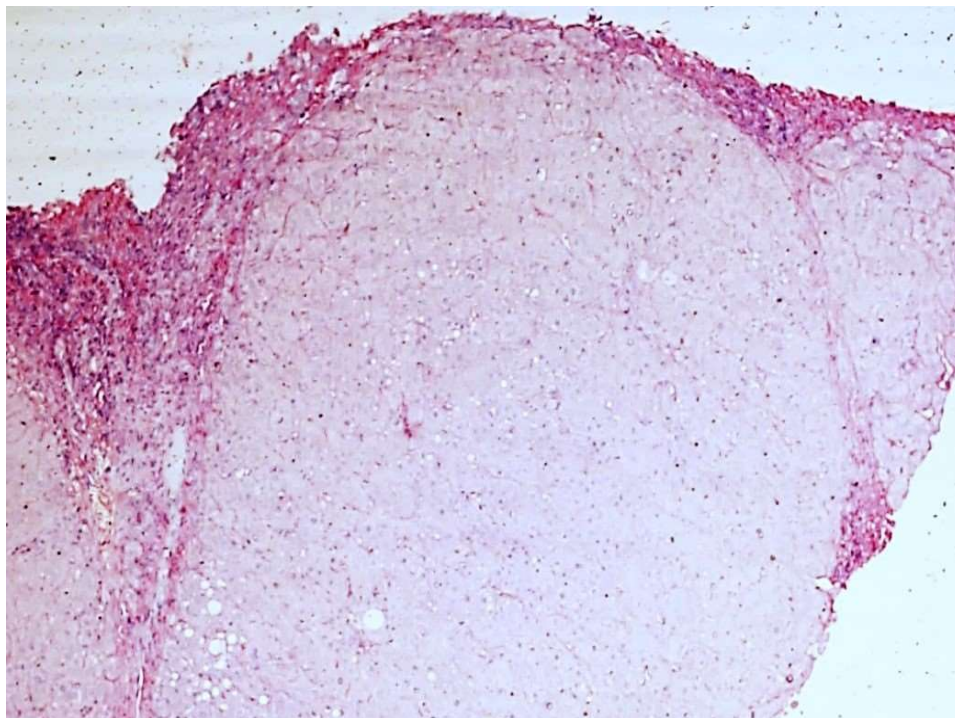
FONTE: Autoria própria

Figura 6 - Espaço-porta com discreta expansão fibrosa, sem septos (Caso 43, Picosírius, x200)



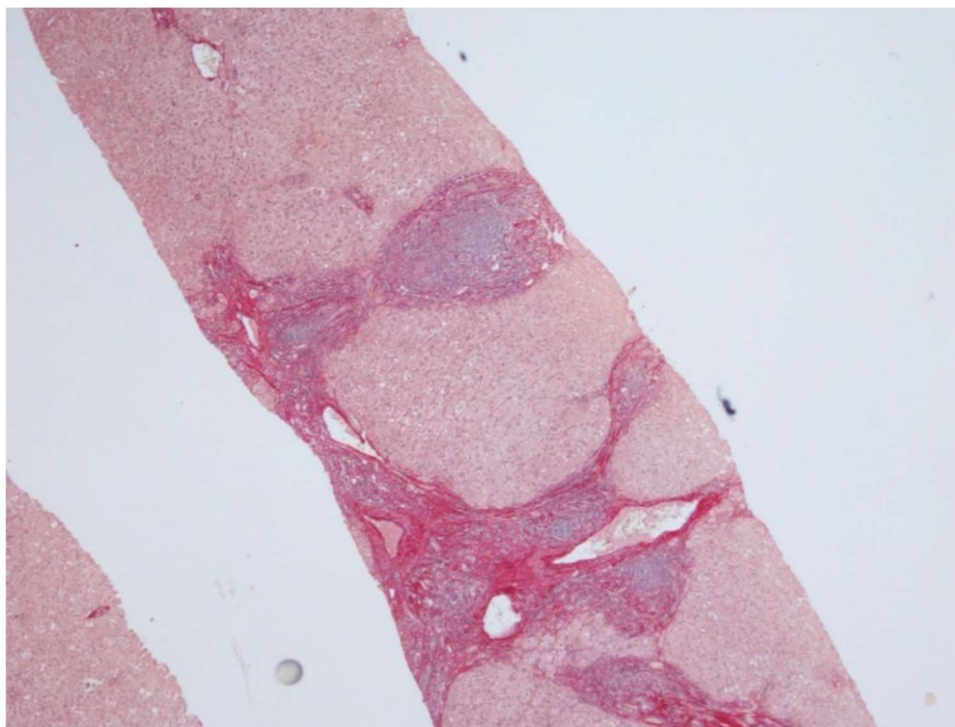
FONTE: Autoria própria

Figura 7 - Expansão fibrosa com formação de septos porta-porta (Caso 56, Picrosírius, x100)



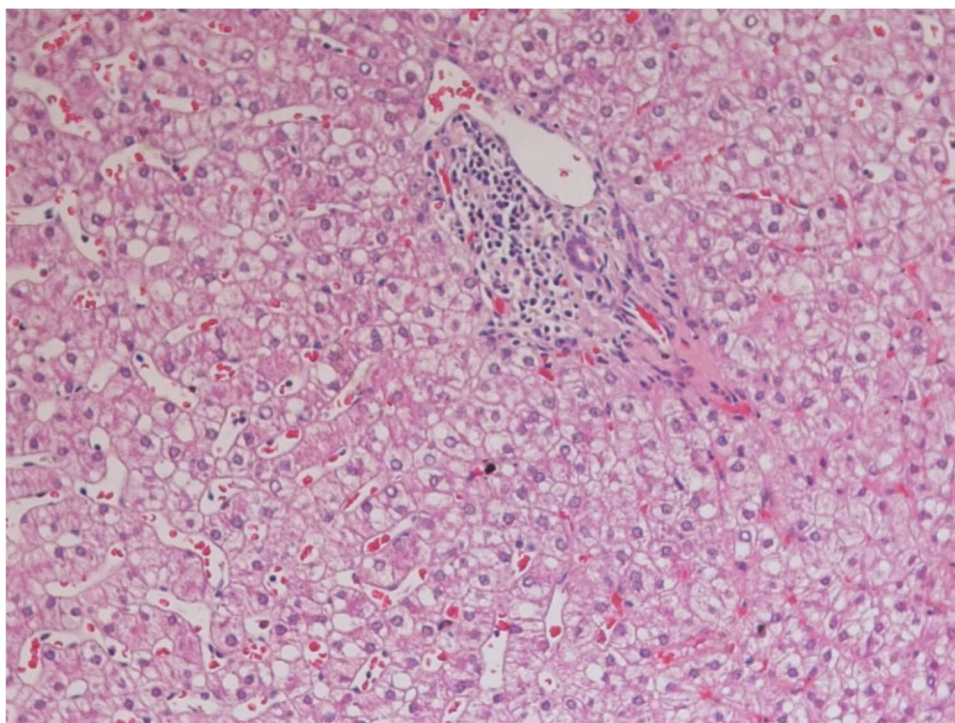
FONTE: Autoria própria

Figura 8 - Alteração estrutural com septos fibrosos que já contornam esboços nodulares (Caso 23, Picrosírius, x100)



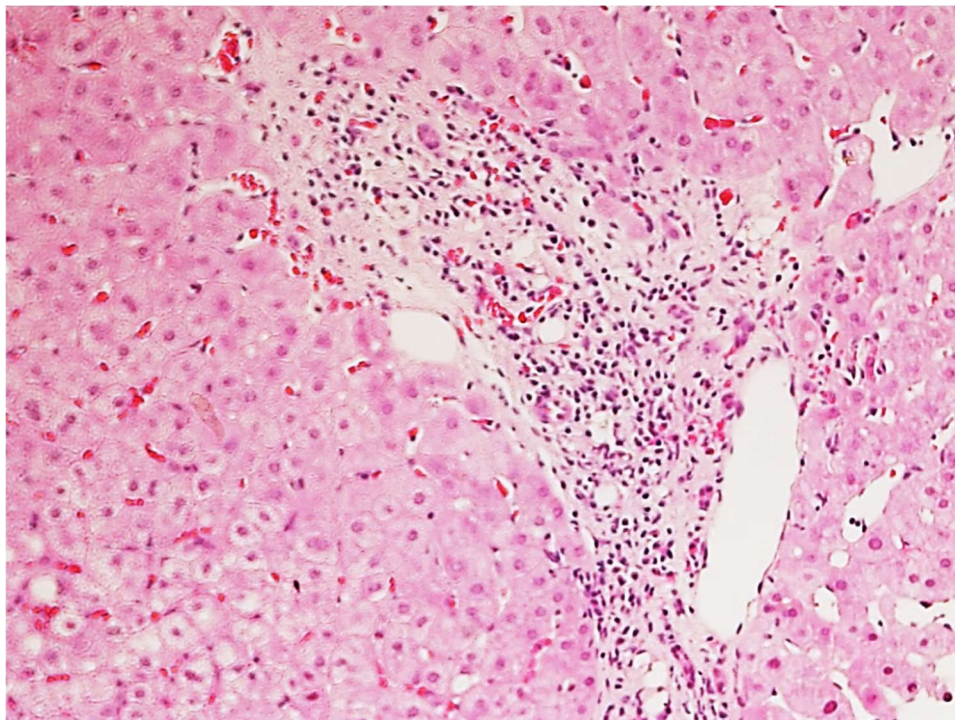
FONTE: Autoria própria

Figura 9 - Alteração estrutural com nódulos cirróticos completos (Caso 47, Picrosírius, x40)



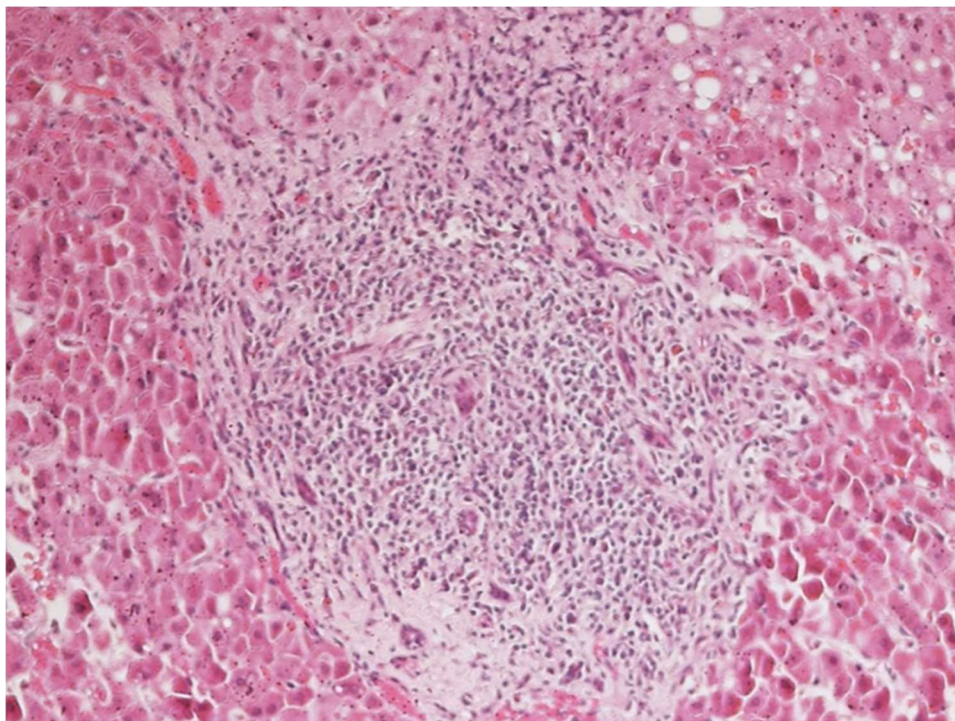
FONTE: Autoria própria

Figura 10 - Atividade inflamatória portal discreta, com poucos linfócitos portais (Caso 22, H.E., x200)



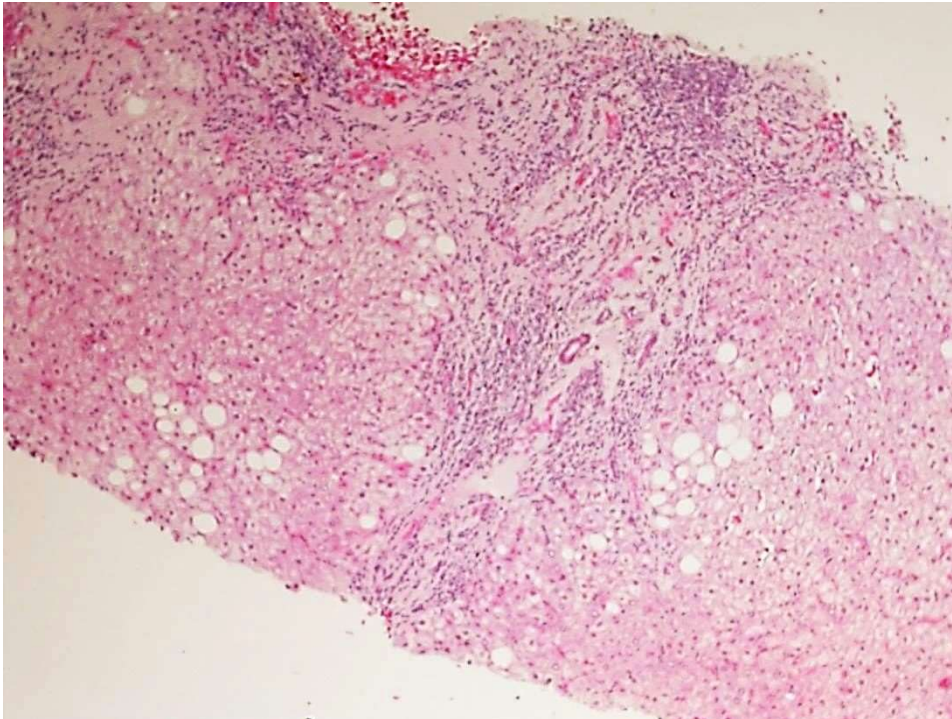
FONTE: Aatoria própria

Figura 11 - Número moderado de linfócitos portais. Ausência de hepatite de interface (Caso 72, H.E., x200)



FONTE: Aatoria própria

Figura 12 - Infiltrado linfocitário portal acentuado. Hepatite de interface discreta (Caso 64, H.E., x200)



FONTE: Autoria própria

Figura 13 - Atividade inflamatória portal e periportal acentuadas, com linfócitos portais e hepatite de interface (“necrose em saca-bocados”) moderada. Presença de esteatose macrogoticular (Caso 66, H.E., x100)

3.5. MÉTODOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

3.5.1. Anticorpos primários

Os anticorpos primários testados são de origem comercial. A tabela 1 mostra os parâmetros utilizados na reação de imuno-histoquímica dos anticorpos primários para o estudo do padrão de brotos e vasos sanguíneos e linfáticos e a eventual capilarização.

Tabela 1 - Anticorpos primários para estudo do padrão de brotos e vasos e de eventual capilarização e anticorpo primário anti-actina músculo-específica

| Antígeno | Clone do Anticorpo | Marca | Diluição | Recuperação/p H |
|--|--------------------|--------------------|----------|-----------------|
| CD34 Vasos sanguíneos | QBEnd | VENTANA (ROCHE) | 500 | pv, 6 |
| Podoplanina Vasos linfáticos | D2-40 | DAKO | 100 | pv, 6 |
| Actina de músculo liso Vasos sanguíneos muscularizados | 1A4 | DAKO | 800 | pv, 6 |

pv: panela a vapor

3.5.2. Reações imuno-histoquímicas

Em todas as reações, as amostras dos 72 casos foram submetidas simultaneamente aos mesmos procedimentos, acompanhadas pelas amostras controles positivos, sendo também realizada reação em uma lâmina controle negativo, substituindo-se a incubação do anticorpo primário por incubação com soro fetal bovino (BSA), que é o diluente do anticorpo concentrado. Todas as demais etapas foram idênticas em todos os casos e controles.

Etapas para reação de imuno-histoquímica:

1. Desparafinação completa dos cortes através de incubação com xilol (Allkimia) a 60°C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol (Allkimia) à temperatura ambiente por 20 minutos.
2. Hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 4 banhos e etanol (Dinâmica) a 80% com 1 banho, lavagem em água corrente e água destilada.
3. Recuperação antigênica mediante incubação em panela elétrica a vapor (pv) por 35 minutos utilizando a solução de recuperação antigênica

3+ diluída 1/100 em água destilada (Spring, PMB1-250 – 100x Tampão citrato).

4. Resfriamento por 20 minutos à temperatura ambiente para lavagens em água corrente e água destilada.

5. Bloqueio da peroxidase endógena do tecido com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 volumes (Dinâmica) e álcool metílico (Alkimia) na proporção de volume/volume em 3 incubações por 10 minutos cada.

6. Lavagem em água corrente seguida de tampão fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4.

7. Incubação dos cortes em estufa a 37°C (FANEN, Modelo Orion 502) com bloqueador de ligações não específicas (Cas Block - Life Technologies, 008120) por 10 minutos.

8. Após a remoção do bloqueador, incubação em estufa com anticorpos primários diluídos em BSA (Sigma, A6003-100G) a 37°C por 30 minutos e em seguida incubados a 4°C por 12 horas.

9. Lavagem, de 5 minutos cada, em 3 banhos de PBS.

10. Incubação em estufa com o pós primário (IgG de coelho anti-camundongo) do kit Novolink Max Polymer DS - 1250 testes (Novocastra, RE7280-CE) a 37°C por 30 minutos.

11. Lavagem, de 5 minutos cada, em 3 banhos de PBS.

12. Incubação com o IgG anti-coelho com polímero marcado com enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP) do kit Novolink Max Polymer DS - 1250 testes (Novocastra, RE7280-CE) a 37°C por 30 minutos.

13. Lavagem em 3 banhos de PBS, 5 minutos cada.

14. Incubação em estufa em solução de 1 mg de 3,3-diaminobenzidina hidrato tetracloridato (DAB) (Sigma, D5637) em 100 ml de PBS com 1 ml de dimetilsulfóxido e 1 ml de peróxido de hidrogênio 20% a 37°C por 5 minutos.

15. Lavagem com PBS para parar a reação de precipitação pelo DAB, lavagem com água.
16. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, 1159380025) por 45 segundos.
17. Lavagem em água e incubação com água amoniacal 0,5% por 5 segundos.
18. Remoção da água amoniacal em água corrente.
19. Desidratação dos cortes em concentrações progressivas de etanol a 50%, 80% e 100%, lavagem em água corrente e água destilada.
20. Diafanização em xilol com 3 banhos.
21. Montagem em Entellan (Laboratório Merck, código 10796) com lamínulas.

Todas as reações foram realizadas pela pós-graduanda e analisadas conjuntamente com o orientador.

3.6. AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Cada agrupamento de células marcadas pela reação imuno-histoquímica direcionada à identificação de cada antígeno foi contado manualmente em imagens digitais feitas pela pós-graduanda sob supervisão do orientador. As imagens digitais foram adquiridas através da câmera digital DSFi1 e Digital Sight DS-U3 NIKON acoplada ao microscópio trinocular eclipse E-50i para 2 observadores NIKON. A análise morfométrica das imagens foi feita utilizando o software Image Pro Plus© 4.1.

Em cada caso foram analisados 5 campos com maior concentração (“hot spots”) dos agrupamentos de cada variável estudada em cada compartimento do lóbulo/nódulo hepático, utilizando-se a objetiva de 40x. Somente os grupamentos com marcação bem definida foram contados.

3.6.1. Componentes sanguíneos

A marcação das variáveis imuno-histoquímicas seguiu o padrão de contagem para a análise quantitativa dos componentes sanguíneos:

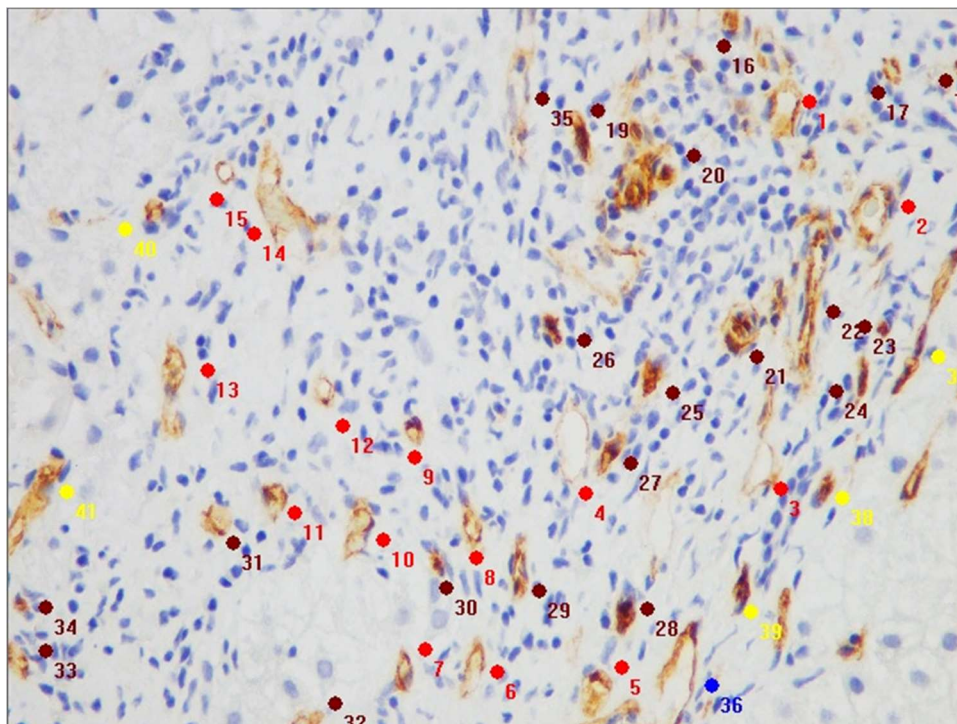
- Broto sanguíneo portal
- Vaso sanguíneo portal
- Broto sanguíneo na interface
- Vaso sanguíneo na interface
- Broto sanguíneo no parênquima
- Vaso sanguíneo no parênquima

3.6.1.1. Brotos sanguíneos portais (BSP)

Os brotos sanguíneos portais (BSP) foram estudados através da marcação do endotélio com o anticorpo anti-CD34 (clone QBend).

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo A. A mediana das médias foi calculada resultando em 7 conforme apresentado no Anexo G.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

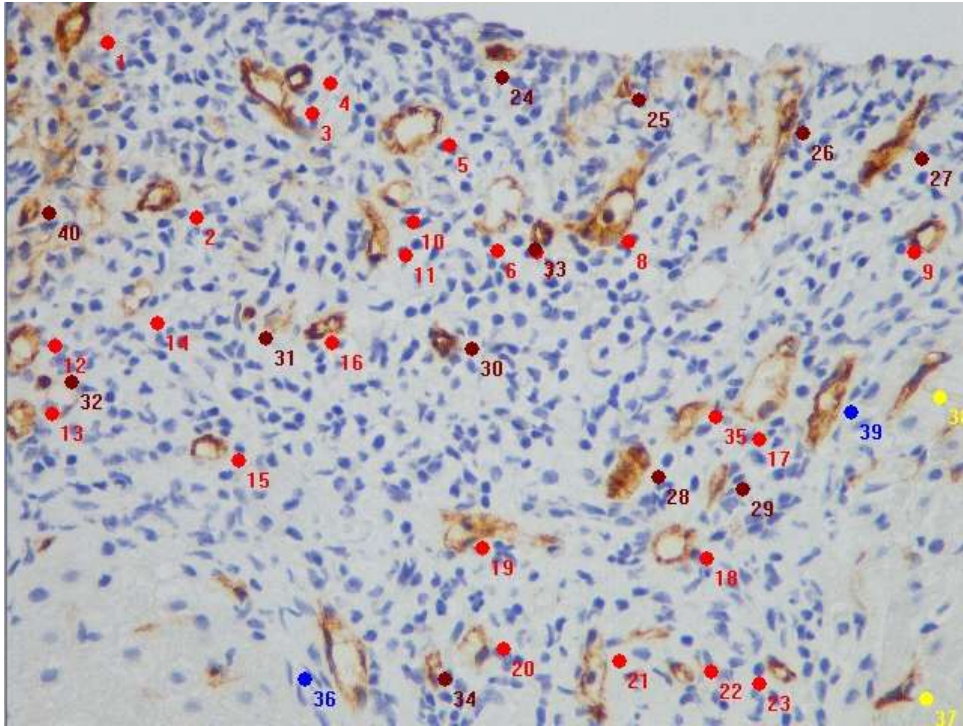
Figura 13 - Número elevado de brotos sanguíneos portais (Caso 50, IHQ, x40)

3.6.1.2. Vasos sanguíneos portais (VSP)

Os vasos sanguíneos portais (VSP) foram estudados através da marcação do endotélio com o anticorpo anti-CD34 (clone QBend).

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo A. A mediana das médias foi calculada resultando em 6 conforme apresentado no Anexo H.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

Figura 14 - Número elevado de vasos sanguíneos portais (Caso 64, IHQ, x40)

3.6.1.3. Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP)

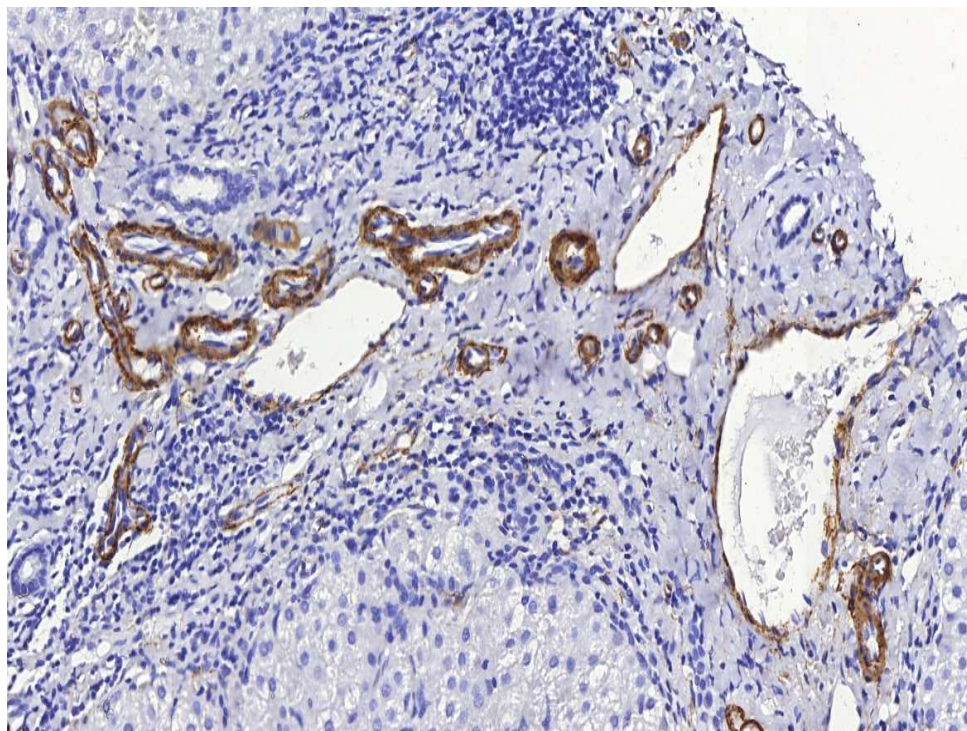
Os vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) foram estudados através da identificação de actina de músculo liso na parede muscular com o anticorpo clone 1A4.

A análise morfológica das imagens foi feita utilizando o software Image Pro Plus© 4.1 atribuindo-se os valores :

- 0- Ausente
- 1- Pouca quantidade de vasos
- 2- Quantidade moderada a elevada de vasos

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo D. A mediana das médias foi calculada resultando em 1 representado no Anexo I.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: A autoria própria

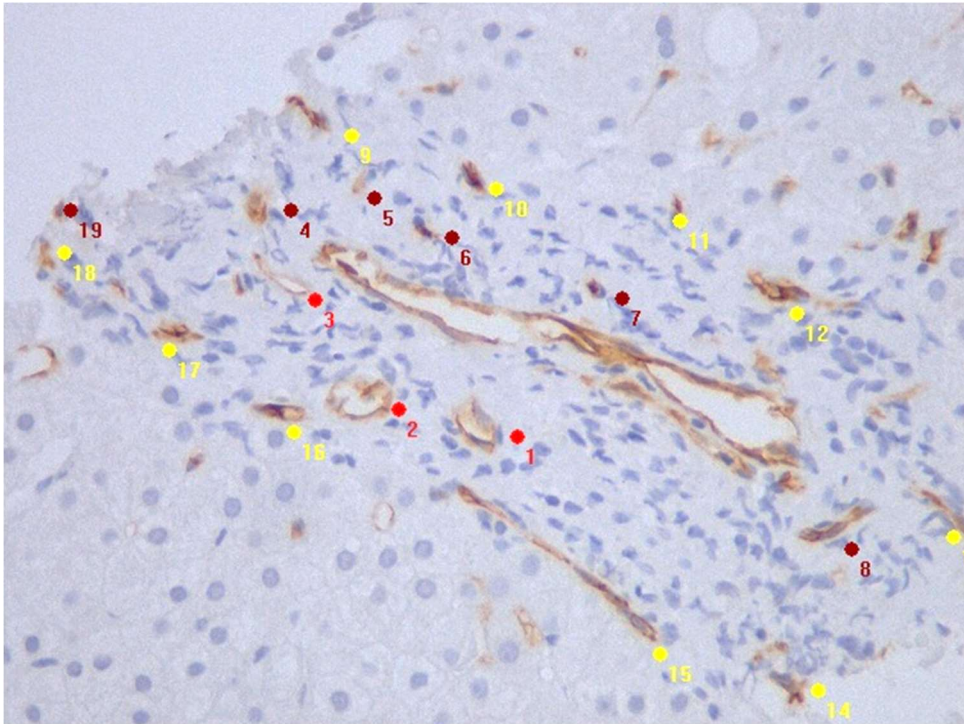
Figura 15 - Número elevado de vasos sanguíneos muscularizados portais (Caso 24, IHQ, x20)

3.6.1.4. Brotos sanguíneos na interface (BSI)

Os brotos sanguíneos na interface (BSI) foram estudados através da identificação de CD34 no endotélio pelo anticorpo anti-CD34, clone QBend.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo B. A mediana das médias foi calculada resultando em 3 representado no Anexo J.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

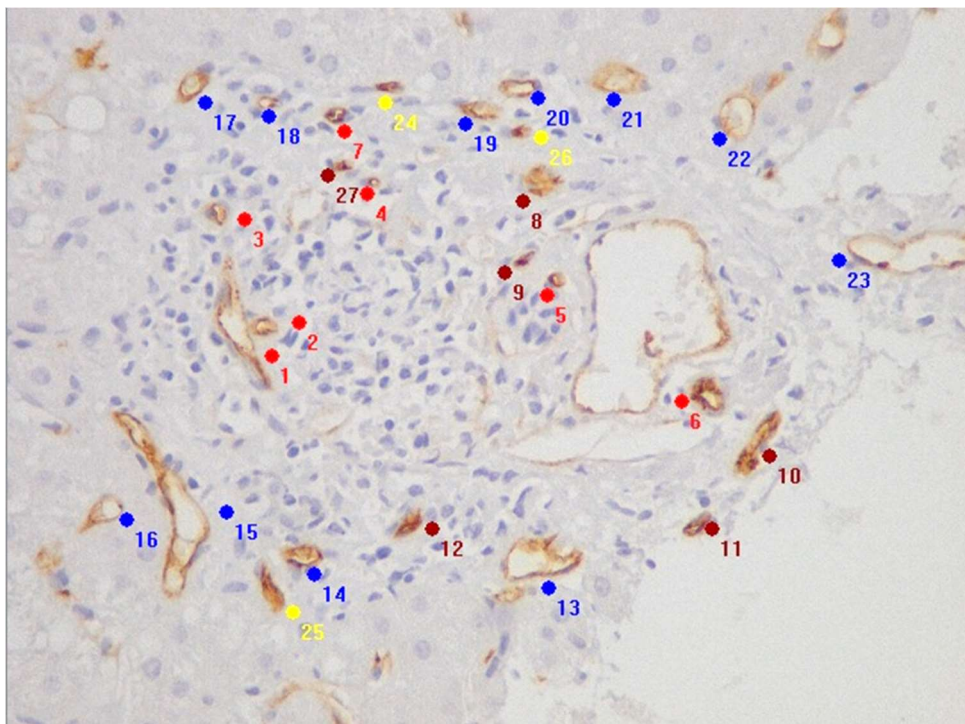
Figura 16 - Número elevado de brotos sanguíneos na interface (Caso 16, IHQ, x40)

3.6.1.5. Vasos sanguíneos na interface (VSI)

Os vasos sanguíneos na interface (VSI) foram estudados através da identificação de CD34 no endotélio pelo anticorpo anti-CD34, clone QBend.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo B. A mediana das médias foi calculada resultando em 2 representado no Anexo K.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

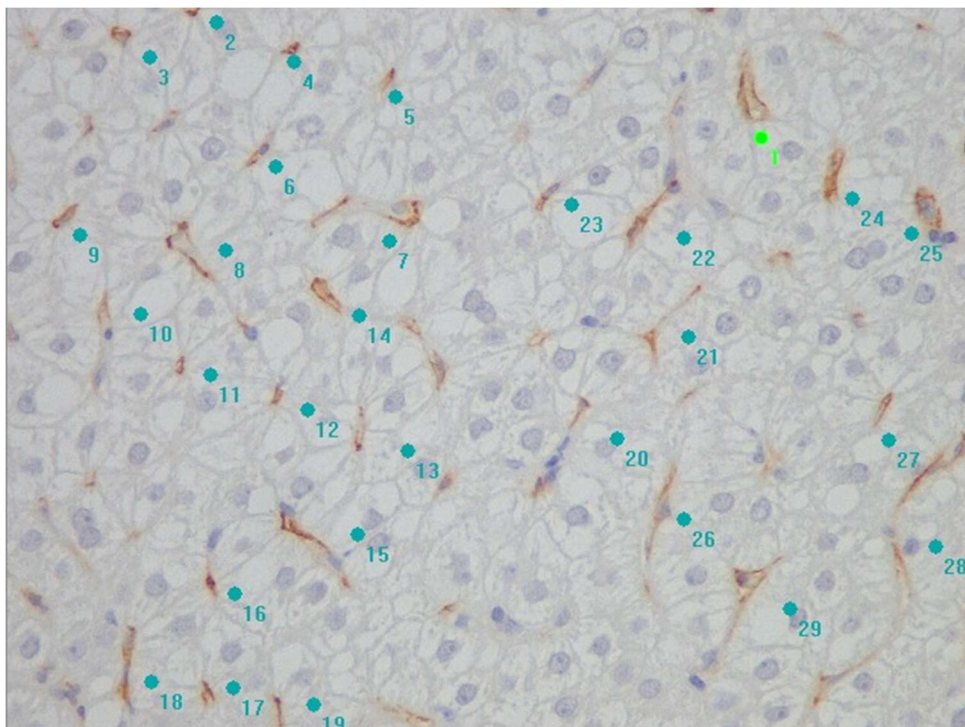
Figura 17 - Número elevado de vasos sanguíneos na interface (Caso 15, IHQ, x40)

3.6.1.6. Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA)

Os brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) foram estudados mediante identificação de CD34 no endotélio através do anticorpo anti-CD34, clone QBend.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo C. A mediana das médias foi calculada resultando em 7 representado no Anexo L.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

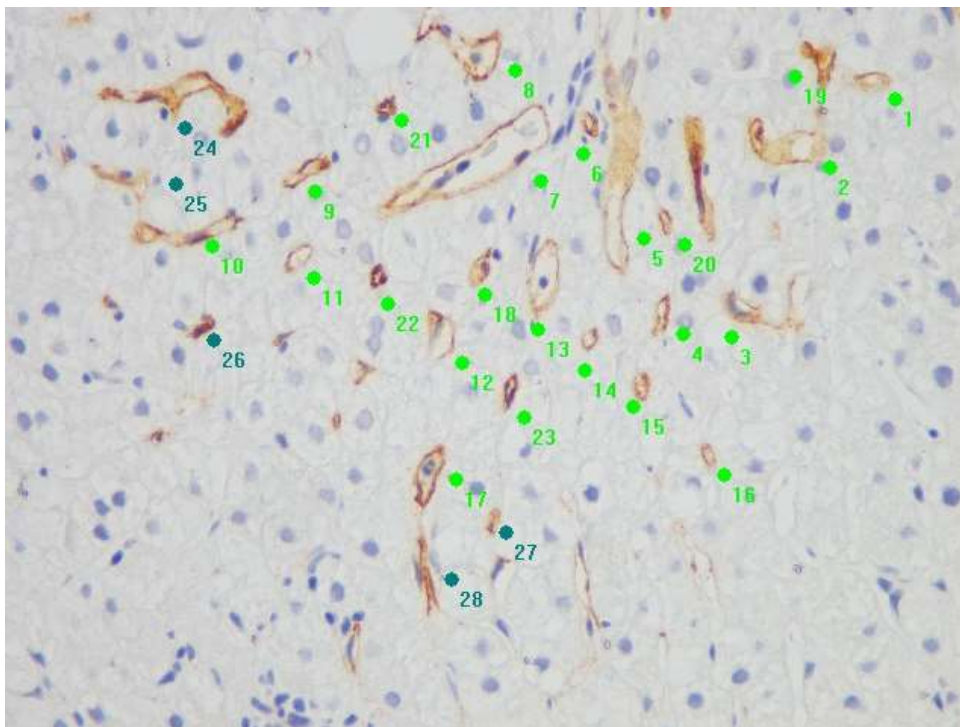
Figura 18 - Número elevado de brotos sanguíneos no parênquima (Caso 26, IHQ, x40)

3.6.1.7. Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA)

Os vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) foram estudados através da identificação de CD34 no endotélio mediante o anticorpo anti-CD34, clone QBend.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo C. A mediana das médias foi calculada resultando em 5 representado no Anexo M.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

Figura 19 - Número elevado de vasos sanguíneos no parênquima (Caso 52, IHQ, x40)

3.6.1.8. Vasos sanguíneos muscularizados no parênquima (VSMPA)

Os vasos sanguíneos muscularizados no parênquima (VSMPA) foram estudados através da identificação de actina de músculo liso na parede vascular mediante o anticorpo anti-actina de músculo liso, clone 1A4.

A análise morfométrica das imagens foi feita utilizando o software Image Pro Plus© 4.1 atribuindo-se:

- 0- Ausente
- 1- Pouca quantidade de vasos
- 2- Quantidade moderada a elevada de vasos

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo D. A mediana das médias foi calculada resultando em 0 representado no Anexo N.

Tendo como base a mediana, os casos graduados 0 foram classificados como “baixo grau” e aqueles que apresentaram alguma estrutura vascular de parede muscular no parênquima foram graduados como “alto grau”.

3.6.2. Componentes linfáticos

A marcação das variáveis imuno-histoquímicas segue o padrão de contagem para a análise quantitativa dos componentes linfáticos:

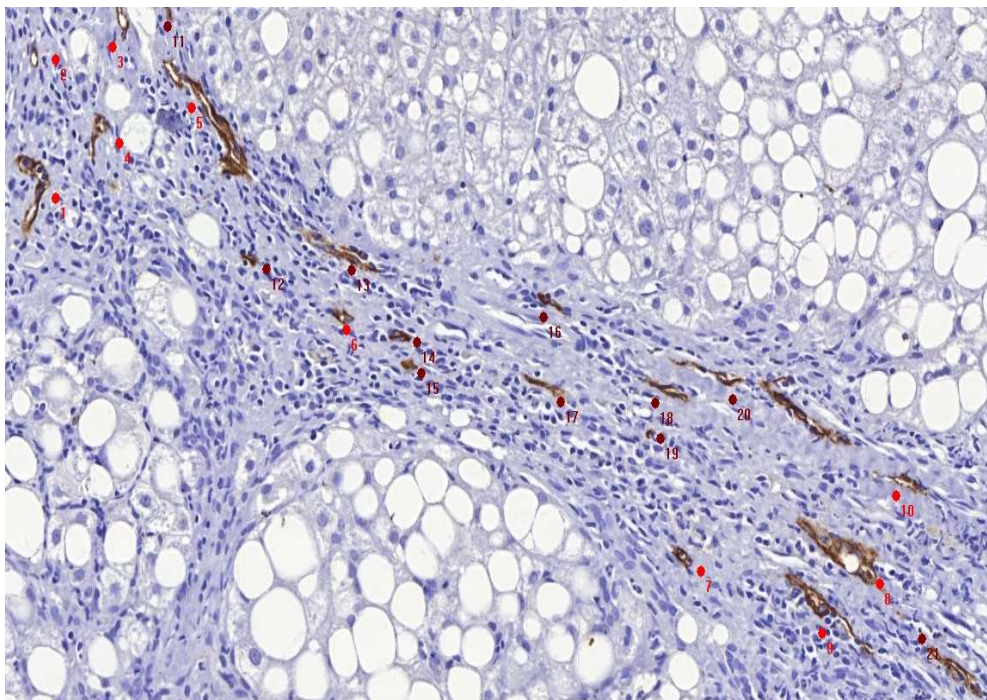
- Broto linfático portal
- Vaso linfático portal
- Broto linfático na interface
- Vaso linfático na interface
- Broto linfático no parênquima
- Vaso linfático no parênquima

3.6.2.1. Brotos linfáticos portais (BLP)

Os brotos linfáticos portais (BLP) foram estudados através do anticorpo anti-podoplanina, clone D2-40.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo E. A mediana das médias foi calculada resultando em 2 representado no Anexo O.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

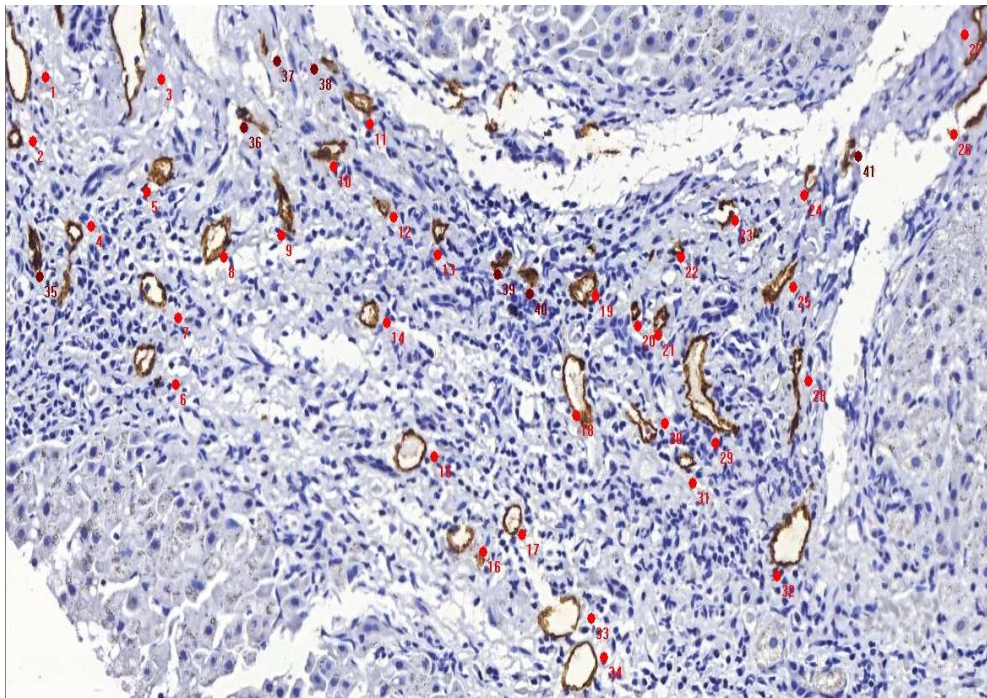
Figura 20 - Número elevado de brotos linfáticos portais (Caso 42, IHQ, x20)

3.6.2.2. Vasos linfáticos portais (VLP)

Os vasos linfáticos portais (VLP) foram estudados através do anticorpo anti-podoplanina, clone D2-40.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo E. A mediana das médias foi calculada resultando em 7 representado no Anexo Q.

Tendo como base a mediana, os casos foram classificados como sendo abaixo da mediana (baixo grau) e acima da mediana (alto grau).



FONTE: Autoria própria

Figura 21 - Número elevado de vasos linfáticos portais (Caso 55, IHQ, x20)

3.6.2.3. Brotos linfáticos na interface (BLI)

Os brotos linfáticos na interface (BLI) foram estudados através da identificação de podoplanina com uso do anticorpo anti-podoplanina, clone D2-40. Em cada caso foram analisados 5 campos com maior concentração de brotos linfáticos da região da interface utilizando-se da objetiva de 20x. Somente os brotos com marcação definida foram considerados.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo F. A mediana das médias foi calculada resultando em 0 representado no Anexo Q.

Desta forma, os casos nos quais não houve identificação de brotos linfáticos marcados para podoplanina na interface foram classificados como “baixo grau” (no caso, negativos) e os casos com qualquer número de estruturas compatíveis com brotos linfáticos marcados para podoplanina na interface foram classificados como “alto grau” (“positivos”).

3.6.2.4. Vasos linfáticos na interface (VLI)

Os vasos linfáticos na interface (VLI) foram estudados através da identificação de podoplanina pelo anticorpo anti-podoplanina, clone D2-40.

Calculou-se a média do conjunto das contagens de cada caso demonstrado no Anexo F. A mediana das médias foi calculada resultando em 0 representado no Anexo R.

Desta forma, os casos nos quais não houve identificação de vasos linfáticos marcados para podoplanina na interface foram classificados como “baixo grau” (no caso, negativos) e os casos com qualquer número de estruturas compatíveis com brotos linfáticos marcados para podoplanina na interface foram classificados como “alto grau” (“positivos”).

3.6.2.5. Brotos linfáticos no parênquima (BLPA)

Apesar de termos pré-definido como potencial variável histológica, nosso estudo não identificou a presença de brotos linfáticos na região do parênquima.

3.6.2.6. Vasos linfáticos no parênquima (VLPA)

Apesar de termos pré-definido como potencial variável histológica, nosso estudo não identificou a presença de vasos linfáticos na região do parênquima.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente estudo é eminentemente descritivo, graduando de modo semi-quantitativo os principais critérios histopatológicos indicadores do estágio do dano da arquitetura do lóbulo em casuística representativa das várias fases da hepatite C crônica, além da demonstração e da quantificação de

estruturas vasculares sanguíneas e linfáticas em cada componente dos lóbulos/nódulos. Mesmo assim, a pesquisa de possíveis associações entre as variáveis imuno-histoquímicas indicadoras dos padrões de vasos sanguíneos e linfáticos e os critérios histológicos da hepatite C crônica, critérios histológicos da doença gordurosa e genótipo utilizamos o teste Qui-quadrado considerando o índice de significância adotando-se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE LESÃO HEPÁTICA

4.1.1. Lesões associadas à hepatite C crônica

Os resultados da análise histopatológica com base em critérios semiquantitativos de cada amostra conforme classificação proposta por Gayotto et al.⁹³ estão no Anexo S.

Dentro do critério histológico **estadiamento**, encontramos no total de 72 pacientes sorologicamente positivos para VHC, 7 casos (10%) no estágio 0 (nenhum dano significativo na arquitetura lobular (Figura 5), 19 casos (26%) no estágio 1 (expansão fibrosa de espaços-porta) (Figura 6), 15 casos (21%) no estágio 2 (expansão portal com septos porta-porta) (Figura 7), 16 casos (22%) no estágio 3 (preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro esboços nodulares, geralmente incompletos) (Figura 8) e 15 casos (21%) no estágio 4 (cirrose, plenamente identificada ou predomínio de áreas nodulares em relação a lóbulos remanescentes) (Figura 9). Consolidando os achados, vemos que 41 dos 72 casos (57%) exibiam alterações estruturais leves, grau 0 a grau 2, e 31 (43%) exibiam lesões avançadas, grau 3 ou 4.

Na variável histológica **infiltrado inflamatório portal/septal**, não encontramos casos com raros linfócitos portais (grau 0), ao passo que 12 casos (17%) apresentaram aumento discreto do número de linfócitos portais (grau 1) (Figura 10), 31 casos (43%) com aumento moderado do número de linfócitos portais (grau 2) (Figura 11), 25 casos (35%) com aumento acentuado do número de linfócitos portais (grau 3) (Figura 12) e 4 casos (5%) com aumento muito acentuado do número de linfócitos portais (grau 4) (Figura 13).

Quanto à variável histológica **atividade periportal/peri-septal**, ou atividade de interface, encontramos 8 casos (11%) sem lesões da interface espaço porta/parênquima (grau 0), 8 casos (11%) com extravasamento de linfócitos para a interface (grau 1), 23 casos (32%) com discreta necrose em saca-bocados (grau 2), 31 casos (43%) com necrose moderada em saca-bocados (grau 3) e 2 casos (3%) com necrose extensa em saca-bocados (grau 4).

Referente à variável histológica **atividade necro-inflamatória intralobular/ parenquimatosa**, observamos 3 casos (4%) com hepatócitos normais, sem infiltrado leucocitário nos lóbulos (grau 0), 28 casos (39%) com alterações discretas de hepatócitos, discreto infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose (grau 1), 29 casos (40%) com necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios (grau 2), 11 casos (16%) com necrose focal de hepatócitos, com significativo infiltrado linfo-histiocitário em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente (grau 3), e apenas 1 caso (1%) com necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios, associada a necrose confluyente extensa/múltipla (grau 4).

4.1.2. Lesões associadas à doença gordurosa do fígado

Os achados da análise histopatológica dos critérios semiquantitativos de lesões referentes a doença gordurosa do fígado em cada amostra conforme classificação proposta por Kleiner et al.⁹⁶ estão expostos no Anexo T.

A esteatose macrogoticular esteve ausente ou detectada em menos de 5 % dos hepatócitos em 25 casos (35%) (grau 0), enquanto 27 casos (38%) apresentando até 30% de hepatócitos com esteatose (grau 1), 14 casos (19%) com 40-60% de hepatócitos com esteatose e 6 casos (8%) com mais que 70% de hepatócitos com esteatose.

Cinquenta e quatro casos (75%) não tiveram o diagnóstico de esteato-hepatite (grau 0) enquanto 18 casos (25%) foram diagnosticados como esteato-hepatite (grau 1).

Em relação as lesões indicadoras de atividade da doença gordurosa, observamos que a balonização não esteve presente em 35 casos (49%) (grau 0), mostrou-se leve em 20 casos (28%) (grau 1) e moderada/acentuada em 17 casos (23%) (grau 2).

Fibrose pericelular esteve ausente (grau 0) em 13 casos (18%), 35 casos (49%) apresentaram fibrose discreta (grau 1) e 22 casos (30%) com

mostraram fibrose celular extensa (grau 2). Por questões técnicas, 2 casos (3%) permaneceram inclassificáveis.

A pesquisa de fibrose perivenular resultou negativa (grau 0) em 10 casos (14%), fibrose discreta (grau 1) em 40 casos (55%), 15 casos (21%) com fibrose extensa (grau 2). Sete casos (10%) permaneceram inclassificáveis.

4.2. GENÓTIPO

A pesquisa dos genótipos do VHC mostrou que 50 casos (69%) estavam infectados pelo genótipo 1. Em 2 casos houve informe de genótipo 1 sem outra especificação (3%), 24 casos com genótipo 1a (34%), 23 casos com genótipo 1b (32%) e 1 caso genótipo 1a/1b (1%). Os demais 22 casos apresentavam positividade para genótipo 3: 18 casos genótipo 3a (25%) e 4 casos com genótipo 3 sem outra especificação (6%).

4.3. VASOS SANGUÍNEOS

4.3.1. Distribuição dos valores quantitativos de brotos sanguíneos marcados pela reatividade de seu endotélio para CD34

A pesquisa de CD34 nos vasos sanguíneos permitiu identificar células endoteliais formando brotos ou vasos com luz evidente (“maduros”) nos espaços porta, na interface e no parênquima.

A distribuição dos valores obtidos com a contagem de brotos e vasos nos espaços porta, na interface e no parênquima em cada um dos 72 casos está apresentada nos Anexos A, B e C. Os Anexos G, H, J, K, L e M apresentam as medianas das médias dessas positivities, dividindo assim os casos em que cada marcador foi graduado como “baixo grau” e “alto grau”.

Assim, sendo 7 a mediana das médias do número de brotos sanguíneos portais (BSP), em 41 casos o valor de brotos sanguíneos portais foi classificado como de baixo grau e os demais 31 como de alto grau.

Com a mediana das médias dos vasos sanguíneos portais (VSP) sendo 6, 37 casos foram classificados como baixo grau e 35 casos como alto grau.

A contagem de brotos sanguíneos na interface (BSI) resultou em mediana das médias de sendo 3, classificando 44 casos como baixo grau e 28 como alto grau.

A contagem de vasos sanguíneos região de interface (VSI), resultou em mediana das médias sendo 2, classificando 47 casos como baixo grau e 25 como alto grau.

Tendo como mediana das médias o valor 7, em 42 casos os brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) foram classificados como baixo grau, enquanto 30 foram considerados como alto grau.

Em relação aos vasos sanguíneos no parênquima (VSPA), a mediana das médias foi 5, e assim 37 casos foram classificados como baixo grau e 35 casos como alto grau.

4.3.2. Distribuição dos valores quantitativos de vasos sanguíneos muscularizados marcados pela reatividade de sua camada muscular para actina de músculo liso com anticorpo 1A4

A pesquisa de actina de músculo liso permitiu avaliar a presença de vasos sanguíneos com parede muscular nos espaços portas e nos septos. Tais vasos, podendo corresponder a ramos arteriais distendidos ou enovelados ou estruturas venosas que adquiriram parede muscular reforçada, provavelmente relacionados a alterações pressóricas, são um achado intrigante do presente estudo.

A distribuição dos valores obtidos com a semiquantificação de vasos sanguíneos muscularizados nos espaços-porta e nos septos em cada um dos 72 casos está apresentada no Anexo D. O Anexo I e N apresenta as medianas das médias dessas positivities, dividindo assim os casos em que cada marcador foi graduado como “baixo grau” e “alto grau”.

Com a mediana das médias dos vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) sendo 1, 53 casos foram classificados como baixo grau e 19 casos como alto grau.

A pesquisa por vasos de parede muscularizada mediante identificação de actina, usando-se anticorpo 1A4 também foi realizada na interface e no parênquima, mas seu resultado foi negativo em todas as amostras.

4.4. COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES QUANTITATIVOS DOS VASOS SANGUÍNEOS DOS DIVERSOS COMPARTIMENTOS

A comparação entre os valores quantitativos de vasos sanguíneos dos diferentes compartimentos segue nos anexos U, V e W.

4.4.1. Comparação entre os valores quantitativos de brotos, vasos sanguíneos e vasos sanguíneos muscularizados portais

As comparações dos valores quantitativos entre os brotos sanguíneos portais, vasos sanguíneos portais e vasos sanguíneos muscularizados portais estão expostas nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos portais e vasos sanguíneos portais

| | | Brotos sanguíneos portais | | | p<0,01 |
|--------------------------|----------------|---------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | BSP Baixo Grau | BSP Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos sanguíneos portais | VSP Baixo Grau | 37 | 0 | 37 | |
| | VSP Alto Grau | 4 | 31 | 35 | |
| Total Geral | | 41 | 31 | 72 | |

Observa-se paralelismo no comportamento de brotos e vasos sanguíneos portais, tendo sido encontrado quatro casos com vasos sanguíneos

portais bem constituídos em alto grau desacompanhados de brotos vasculares portais.

Tabela 3 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos portais e vasos sanguíneos muscularizados portais

| | | Brotos sanguíneos portais | | | p<0,01 |
|---|-----------------|---------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | BSP Baixo Grau | BSP Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais | VSMP Baixo Grau | 41 | 12 | 53 | |
| | VSMP Alto Grau | 0 | 19 | 19 | |
| | Total Geral | 41 | 31 | 72 | |

Todos os dezenove casos que apresentaram mais de um vaso sanguíneo muscularizado por espaço porta também apresentaram alta formação de brotos sanguíneos portais. Além destes, outros doze casos tiveram alto grau de formação de brotos sanguíneos portais desacompanhados de vasos muscularizados.

Tabela 4 - Comparação entre os valores de vasos sanguíneos portais e vasos sanguíneos muscularizados portais

| | | Vasos sanguíneos muscularizados portais | | | p<0,01 |
|--------------------------|----------------|---|----------------|-------------|--------|
| | | VSMP Baixo Grau | VSMP Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos sanguíneos portais | VSP Baixo Grau | 37 | 0 | 37 | |
| | VSP Alto Grau | 16 | 19 | 35 | |
| | Total Geral | 53 | 19 | 72 | |

Todos os dezenove casos que apresentaram mais de um vaso sanguíneo muscularizado por espaço porta também apresentaram alta formação de vasos sanguíneos portais completos. Além destes, outros dezesseis casos tiveram alto grau de formação de vasos sanguíneos portais desacompanhados de vasos muscularizados.

4.4.2. Análise comparativa entre a distribuição das variáveis imuno-histoquímicas no espaço porta e lesões associadas à hepatite C crônica

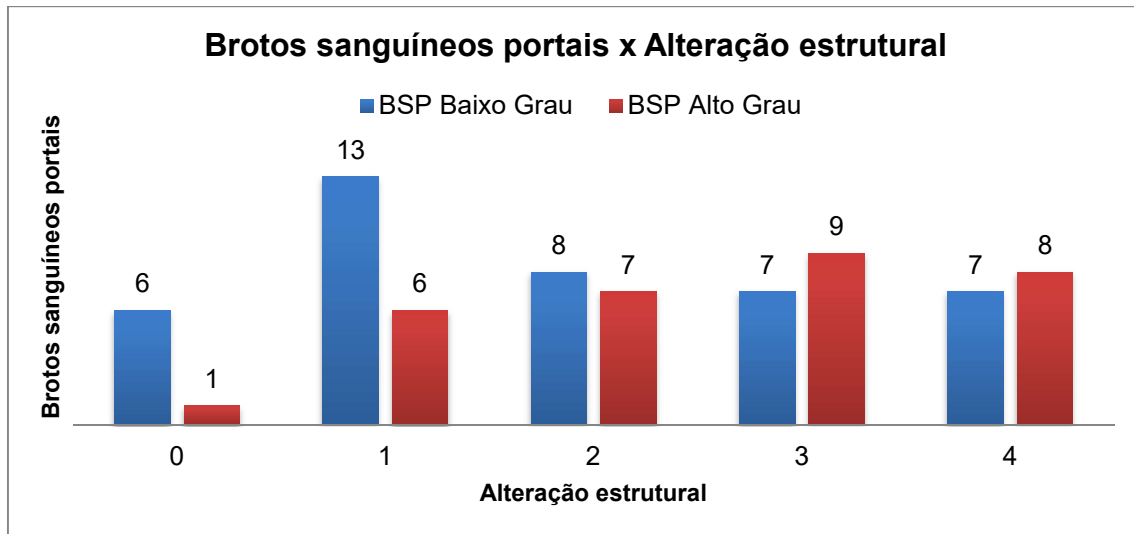
4.4.2.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e lesões associadas à hepatite C crônica

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à hepatite C estão expostas nas tabelas 5, 6, 7 e 8 e gráficos 1 a 10.

Tabela 5 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e alteração estrutural

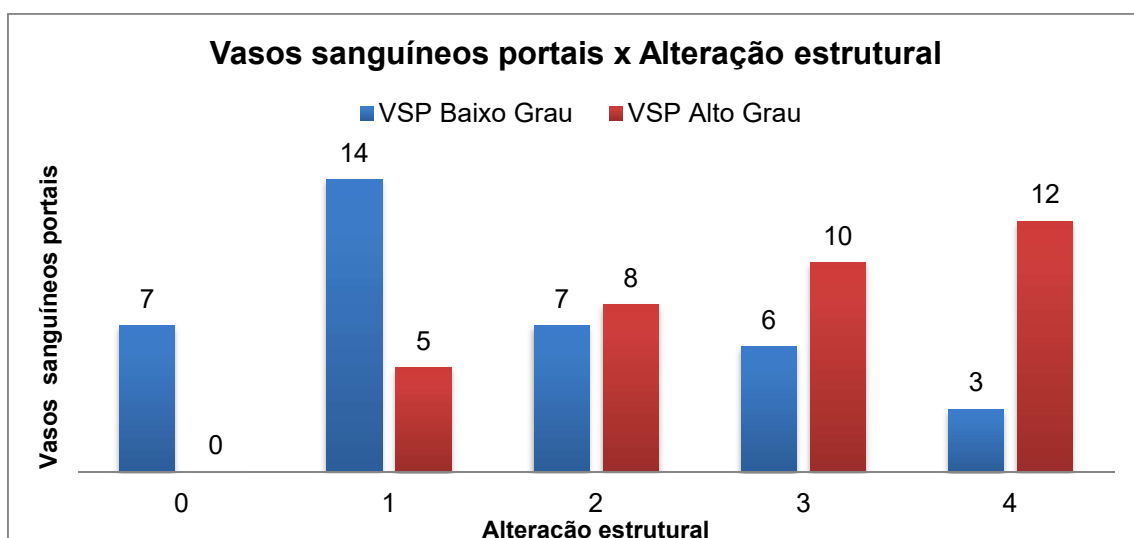
| | | Alteração estrutural | | | | | p | Observação |
|---|-------------------|----------------------|----|----|----|----|-------|----------------|
| | | F0 | F1 | F2 | F3 | F4 | | |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 6 | 13 | 8 | 7 | 7 | 0,07 | Vide gráfico 1 |
| | Alto Grau | 1 | 6 | 7 | 9 | 8 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 7 | 14 | 7 | 6 | 3 | <0,01 | Vide gráfico 2 |
| | Alto Grau | 0 | 5 | 8 | 10 | 12 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 7 | 16 | 13 | 12 | 5 | <0,01 | Vide gráfico 3 |
| | Alto Grau | 0 | 3 | 2 | 4 | 10 | | |

Gráfico 1 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais



Apesar do número de casos com muitos brotos sanguíneos portais ter aumentado, detectamos apenas tendência à associação, com $p=0,07$. Tal aumento parece ser mais relevante nas fases iniciais e intermediárias, sendo similar sua distribuição nas fases F3 e F4.

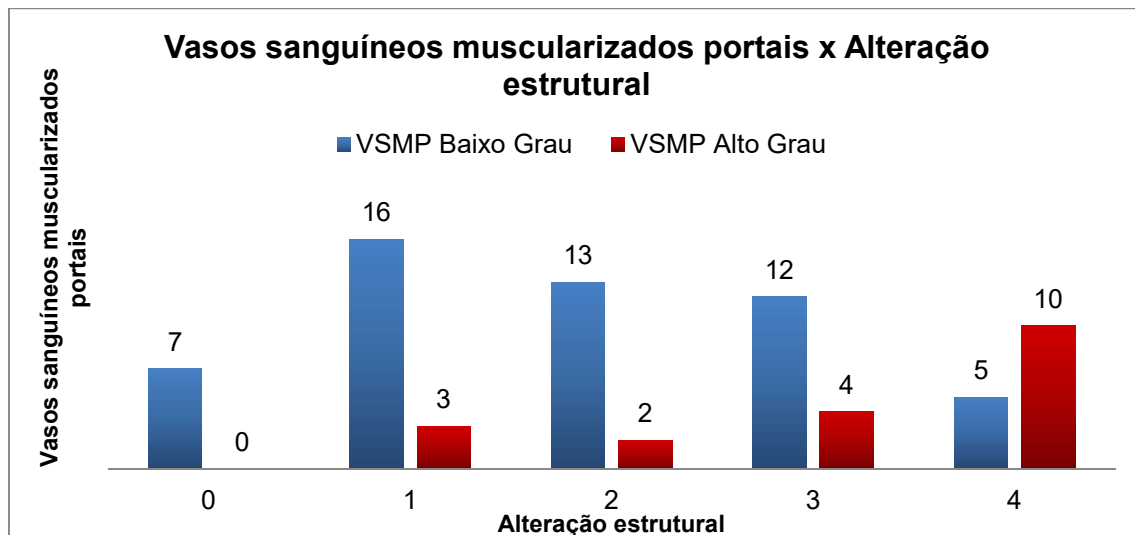
Gráfico 2 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais



A quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos portais mostrou aumento à medida que progrediram as alterações estruturais. Tal

aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de aumento do dano estrutural, sugerindo ativação precoce e mantida da angiogênese portal.

Gráfico 3 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de alteração estrutural

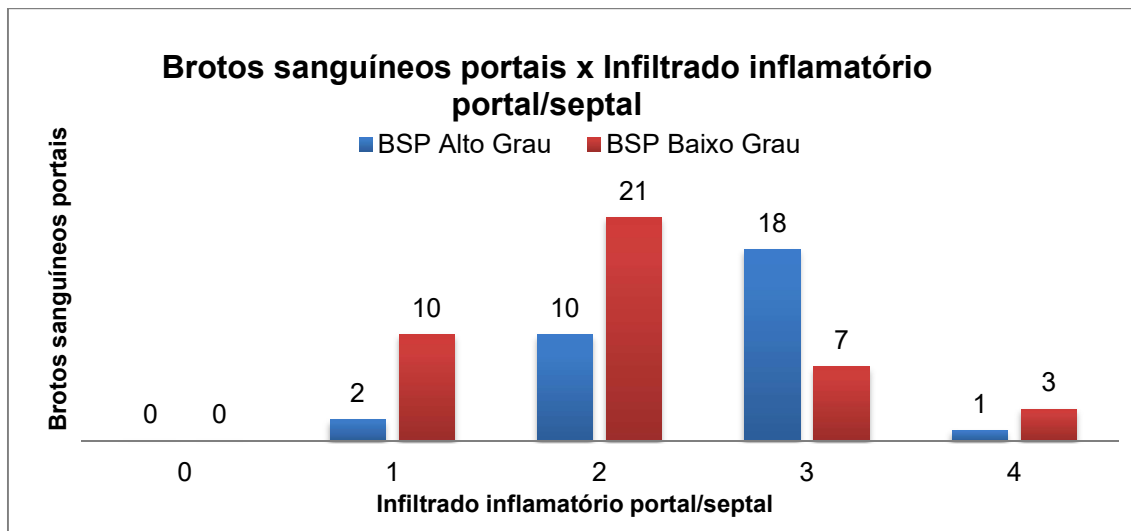


A quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos muscularizados portais mostrou-se significativamente maior no grupo de casos com maior alteração estrutural (F3-F4). Ressalte-se que este aumento é aparentemente maior na transição para a cirrose (F4).

Tabela 6 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e infiltrado inflamatório portal/septal

| | | Infiltrado inflamatório portal/septal | | | | | | |
|---|-------------------|---------------------------------------|----|----|----|---|-------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 0 | 10 | 21 | 7 | 3 | <0,01 | Vide gráfico 4 |
| | Alto Grau | 0 | 2 | 10 | 18 | 1 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 0 | 10 | 15 | 10 | 2 | 0,16 | Ainda que o número de casos com grande quantidade de vasos sanguíneos portais tenha aumentado conforme o grau de infiltrado inflamatório portal, tal aumento não reflete significância estatística. Aparentemente, tal aumento seria mais exuberante entre os graus de inflamação 0 e 1. Vide Anexos X e Y. |
| | Alto Grau | 0 | 2 | 16 | 15 | 2 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 0 | 10 | 24 | 17 | 2 | 0,20 | No presente estudo, não detectamos diferença significativa da proporção de casos com maior ou menor quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais nos espaços-porta e o infiltrado inflamatório portal/septal. Vide Anexos Z e AA. |
| | Alto Grau | 0 | 2 | 7 | 8 | 2 | | |

Gráfico 4 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal

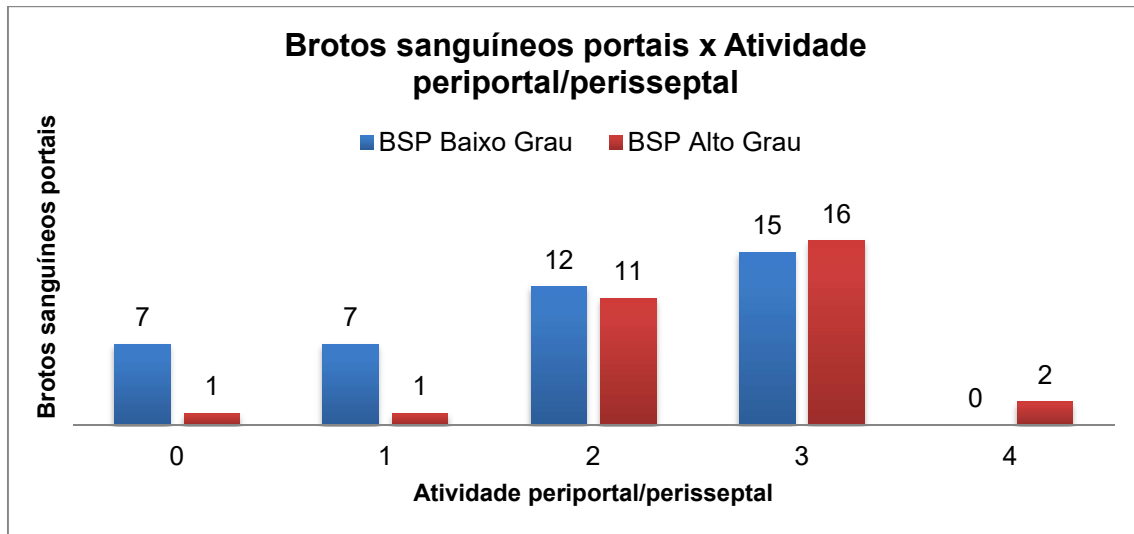


A quantidade de casos com muitos brotos sanguíneos portais aumentou proporcionalmente ao infiltrado inflamatório portal/septal, havendo significância estatística na relação entre essas variáveis.

Tabela 7 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e atividade periportal/perisseptal

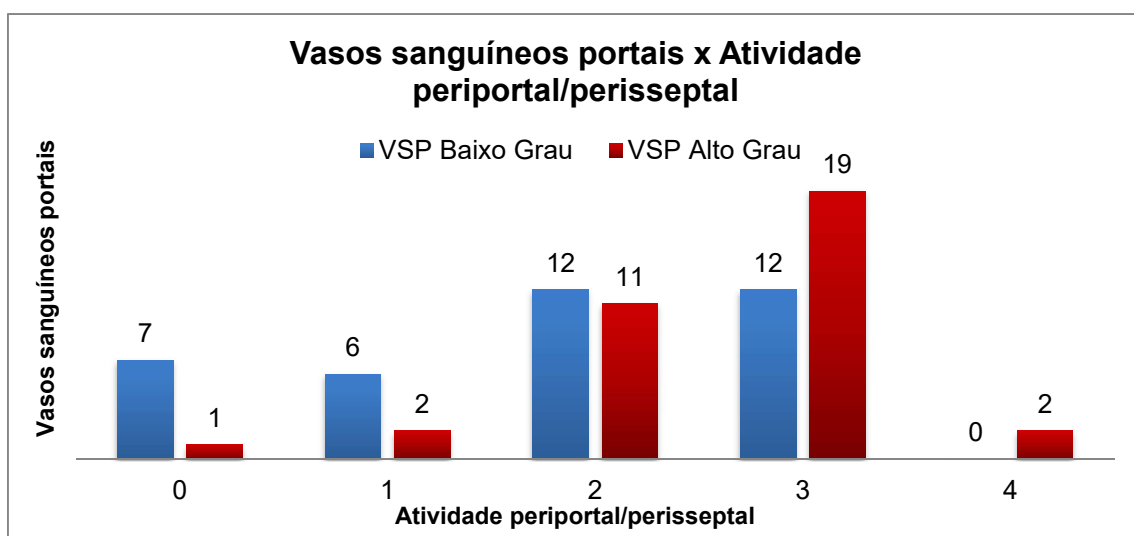
| | | Atividade periportal/perisseptal | | | | | p | Observação |
|---|-------------------|----------------------------------|---|----|----|---|------|----------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 7 | 7 | 12 | 15 | 0 | 0,07 | Vide gráfico 5 |
| | Alto Grau | 1 | 1 | 11 | 16 | 2 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 7 | 6 | 12 | 12 | 0 | 0,01 | Vide gráfico 6 |
| | Alto Grau | 1 | 2 | 11 | 19 | 2 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 8 | 6 | 19 | 20 | 0 | 0,02 | Vide gráfico 7 |
| | Alto Grau | 0 | 2 | 4 | 11 | 2 | | |

Gráfico 5 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal



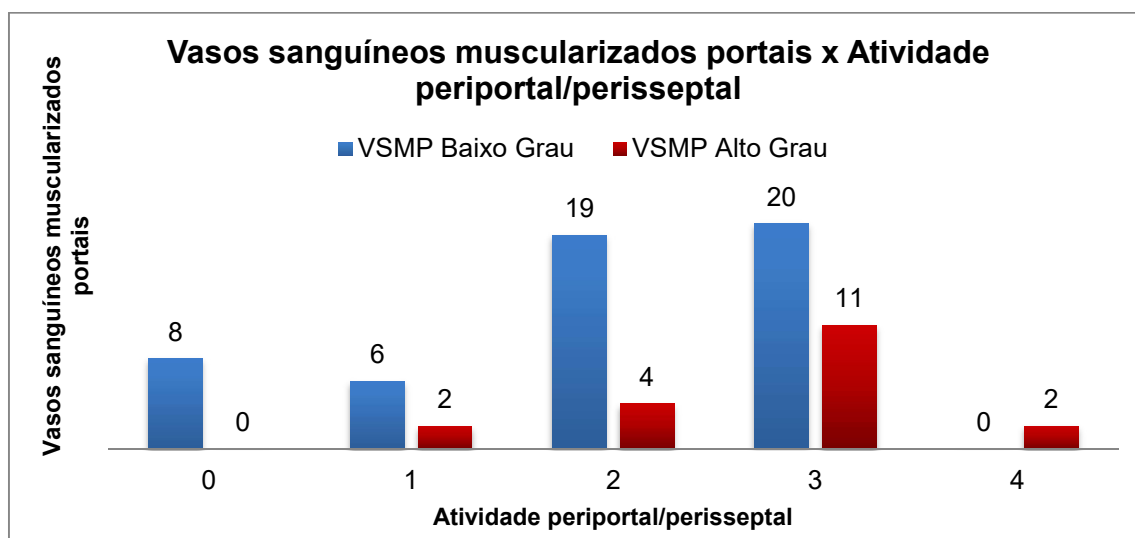
O corte realizado na mediana das médias (grau 2/grau 3) identificou apenas tendência à significância ($p=0,07$), mas a observação por graus mostra aparente crescimento do contingente de brotos sanguíneos portais na transição da atividade periportal/perisseptal 1, considerada como “transbordamento” pelos patologistas, para o grau 2, valorizado como verdadeira “hepatite de interface”.

Gráfico 6 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal



A quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos portais aumentou proporcionalmente à atividade periportal/perisseptal, havendo significância estatística na relação entre essas variáveis. O aumento da angiogênese portal aparentemente é mais acentuado entre os graus de atividade inflamatória periportal 1 e 2 e também de 2 para 3.

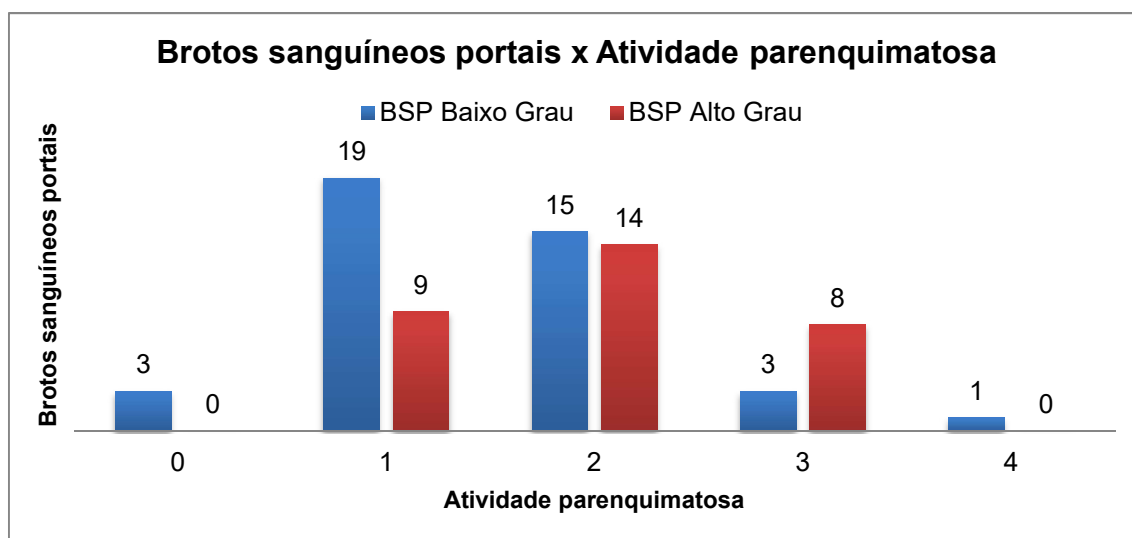
Gráfico 7 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de atividade periportal/perisseptal



A quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos muscularizados portais nos espaços-porta aumentaram proporcionalmente à atividade periportal/perisseptal, havendo significância estatística na relação entre essas variáveis. O aumento de tal neoformação de vasos sanguíneos muscularizados portais é aparentemente mais marcante na transição entre graus 2 e 3 de atividade inflamatória.

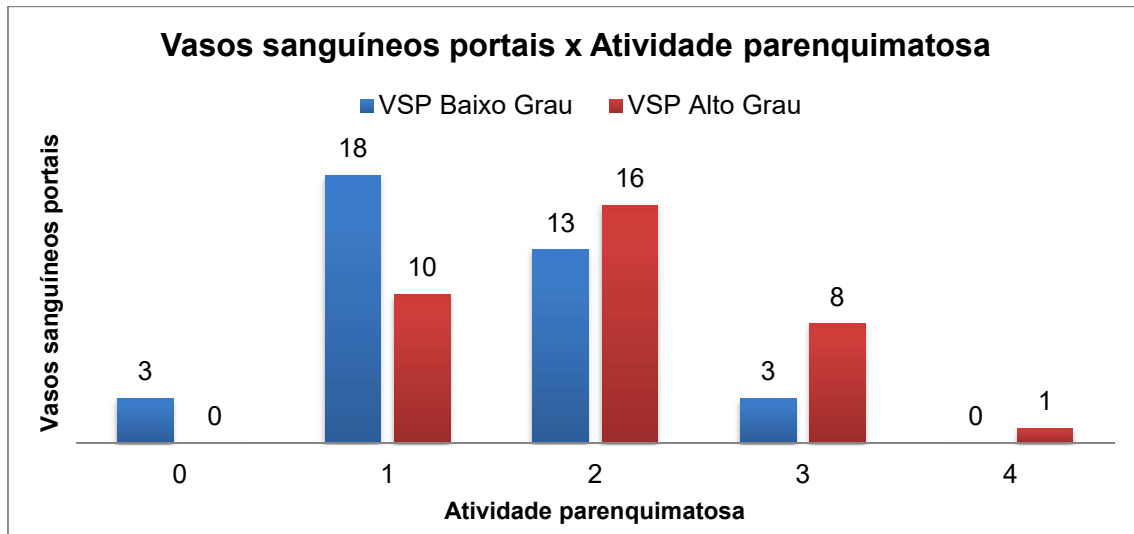
Tabela 8 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e atividade parenquimatosa

| | | Atividade parenquimatosa | | | | | p | Observação |
|---|-------------------|--------------------------|----|----|---|---|-------|-----------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 3 | 19 | 15 | 3 | 1 | 0,03 | Vide gráfico 8 |
| | Alto Grau | 0 | 9 | 14 | 8 | 0 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 3 | 18 | 13 | 3 | 0 | 0,01 | Vide gráfico 9 |
| | Alto Grau | 0 | 10 | 16 | 8 | 1 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 3 | 25 | 18 | 7 | 0 | <0,01 | Vide gráfico 10 |
| | Alto Grau | 0 | 3 | 11 | 4 | 1 | | |

Gráfico 8 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa

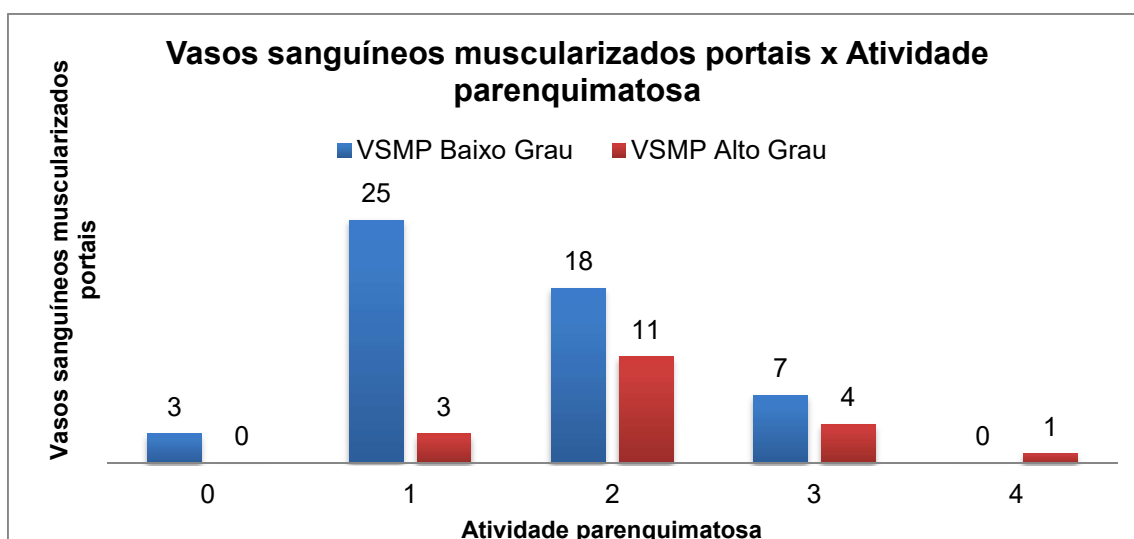
A análise estatística comprova a existência de aumento significativo na quantidade de brotos sanguíneos portais conforme aumenta o grau de atividade parenquimatosa ($p=0,03$). Tal aumento parece relevante desde as formas menos ativas até o grau 3 de inflamação parenquimatosa.

Gráfico 9 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa



A quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos portais mostrou aumento significativo à medida que aumentou a atividade necro-inflamatória parenquimatosa. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de atividade parenquimatosa. Em especial, a transição da atividade periportal grau 1 para 2, muito valorizada na histopatologia, aparentemente acompanha-se de maior ativação da angiogênese portal.

Gráfico 10 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de atividade parenquimatosa



A quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos muscularizados portais mostrou aumento significativo à medida que aumentou a atividade necro-inflamatória parenquimatosa. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de atividade parenquimatosa. Em especial, a transição da atividade periportal grau 1 para 2, muito valorizada na histopatologia, aparentemente acompanha-se de maior ativação da neoformação de vasos sanguíneos muscularizados nos espaços porta.

4.4.2.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e lesões associadas à doença gordurosa do fígado

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à doença gordurosa do fígado estão expostas nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e esteatose

| | | Esteatose | | | | | |
|---|-------------------|-----------|----|----|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 15 | 16 | 8 | 2 | 0,46 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos portais e a esteatose. Vide Anexos BB e CC. |
| | Alto Grau | 10 | 11 | 6 | 4 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 15 | 12 | 6 | 4 | 0,88 | A quantidade de casos com muitos vasos ou com poucos vasos sanguíneos portais não se mostrou relacionada à presença ou aos graus de esteatose. Vide Anexos DD e EE. |
| | Alto Grau | 10 | 15 | 8 | 2 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 20 | 19 | 10 | 4 | 0,66 | A quantidade de casos com muitos vasos ou com poucos vasos sanguíneos muscularizados portais não se mostraram relacionadas à presença dos graus de esteatose. Vide Anexos FF e GG. |
| | Alto Grau | 5 | 8 | 4 | 2 | | |

Tabela 10 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e esteato-hepatite

| | | Esteato-hepatite | | | |
|---|-------------------|------------------|----------|------|--|
| | | Ausente | Presente | p | Observação |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 33 | 8 | 0,21 | A quantidade de casos com muitos brotos ou com poucos brotos sanguíneos portais não se mostrou relacionada à presença de esteato-hepatite. Vide Anexos HH e II. |
| | Alto Grau | 21 | 10 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 29 | 8 | 0,49 | Assim como verificado com relação à esteatose, a quantidade de casos com muitos vasos ou com poucos vasos sanguíneos portais não se mostrou relacionada à presença de esteato-hepatite. Vide Anexos JJ e KK. |
| | Alto Grau | 25 | 10 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 42 | 11 | 0,16 | Assim como verificado com relação à esteatose, a quantidade de casos com muitos vasos ou com poucos vasos sanguíneos muscularizados em espaços-porta não se mostrou relacionada à presença de esteato-hepatite. Vide Anexos LL e MM. |
| | Alto Grau | 12 | 7 | | |

4.4.2.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e o genótipo do VHC

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e o genótipo está exposto na tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos portais e genótipo

| | | Genótipo | | | Observação |
|---|-------------------|----------|----|------|--|
| | | 1 | 3 | p | |
| Brotos sanguíneos portais (BSP) | Baixo Grau | 27 | 14 | 0,44 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos portais e os genótipos. Vide Anexos NN e OO. |
| | Alto Grau | 23 | 8 | | |
| Vasos sanguíneos portais (VSP) | Baixo Grau | 27 | 10 | 0,50 | Ainda que os pacientes infectados pelo genótipo 3 do VHC tenham apresentado maior proporção de casos com alto grau de vasos sanguíneos portais, tal diferença não mostrou qualquer tendência à significância estatística. Vide Anexos PP e QQ. |
| | Alto Grau | 23 | 12 | | |
| Vasos sanguíneos muscularizados portais (VSMP) | Baixo Grau | 37 | 16 | 0,91 | O presente estudo não detectou diferenças significativas da formação de vasos sanguíneos muscularizados em espaços-porta em pacientes infectados com VHC genótipo 1 ou 3. Vide Anexos RR e SS. |
| | Alto Grau | 13 | 6 | | |

4.4.3. Comparação entre os valores quantitativos de brotos e vasos sanguíneos na interface

A comparação dos valores quantitativos entre os brotos sanguíneos e vasos sanguíneos na interface está exposta na tabela 12. Vale repetir que no presente estudo não identificamos a presença de vasos muscularizados na interface.

Tabela 12 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos na interface e vasos sanguíneos na interface

| | | Brotos sanguíneos na interface | | |
|-------------------------------|----------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| Vasos sanguíneos na interface | VSI Baixo Grau | 44 | 3 | 47 |
| | VSI Alto Grau | 0 | 25 | 25 |
| Total Geral | | 44 | 28 | 72 |

p<0,01

Os brotos e os vasos sanguíneos de interface tiveram comportamento paralelo, salientando-se aqui a presença de três casos com aumento dos brotos, mas não dos vasos bem constituídos.

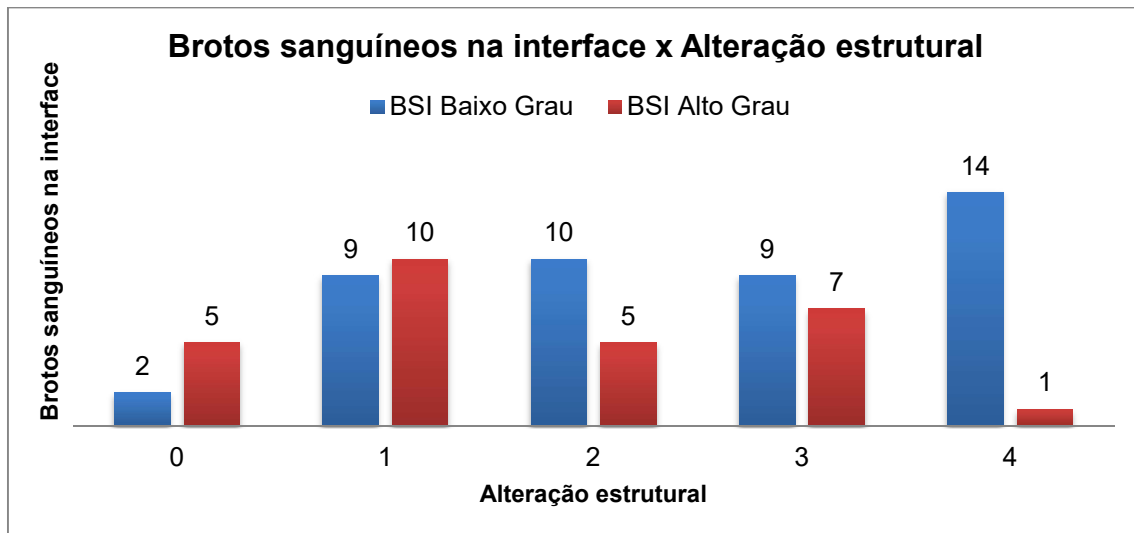
4.4.4. Análise comparativa entre a distribuição das variáveis imuno-histoquímicas na interface e lesões associadas à hepatite C crônica

4.4.4.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos na interface e lesões associadas à hepatite C crônica

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos na interface graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à hepatite C estão expostas nas tabelas 13, 14, 15 e 16 e gráficos 11 e 12.

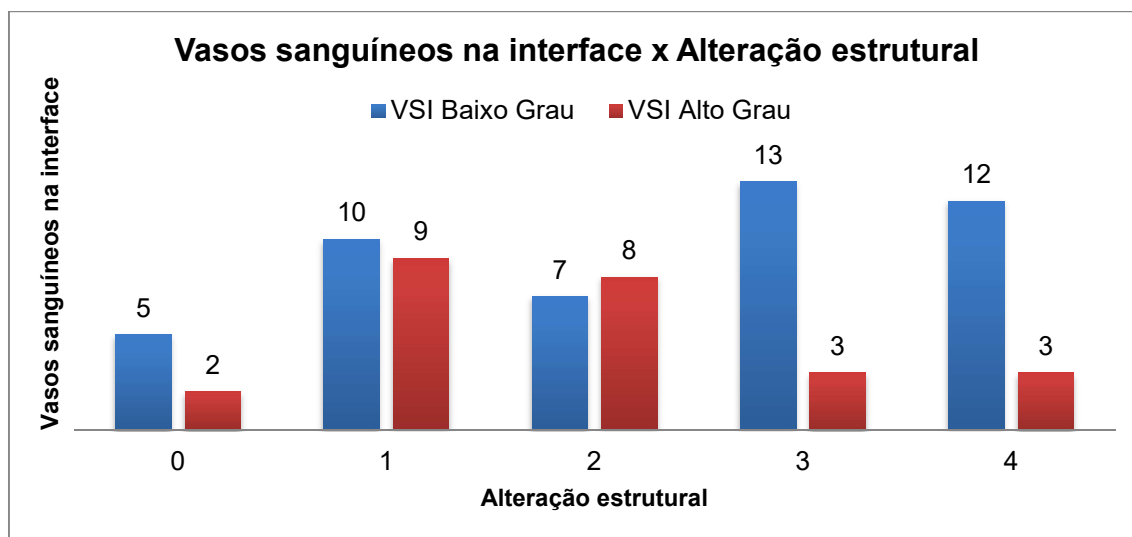
Tabela 13 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e alteração estrutural

| | | Alteração estrutural | | | | | p | Observação |
|--------------------------------------|------------|----------------------|----|----|----|----|------|-----------------|
| | | F0 | F1 | F2 | F3 | F4 | | |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 2 | 9 | 10 | 9 | 14 | 0,04 | Vide gráfico 11 |
| | Alto Grau | 5 | 10 | 5 | 7 | 1 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 5 | 10 | 7 | 13 | 12 | 0,01 | Vide gráfico 12 |
| | Alto Grau | 2 | 9 | 8 | 3 | 3 | | |

Gráfico 11 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais

A associação entre os brotos sanguíneos na interface e a alteração estrutural foi significativa e intrigante. A observação do gráfico mostra aumento da formação de tais brotos nas fases iniciais de dano estrutural, caindo a partir daí e até a fase cirrótica.

Gráfico 12 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais



A associação entre os vasos sanguíneos na interface e a alteração estrutural foi significativa, com aumento da formação dos vasos nas fases iniciais de dano estrutural, caindo a partir daí e até a fase cirrótica. Devemos salientar que tal comportamento foi similar ao observado com os brotos sanguíneos periportais.

Tabela 14 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e infiltrado inflamatório portal/septal

| | | Infiltrado inflamatório portal/septal | | | | | p | Observação |
|--------------------------------------|------------|---------------------------------------|---|----|----|---|----------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 0 | 7 | 18 | 16 | 3 | 0,5 2 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos na interface e o infiltrado inflamatório portal/septal. Vide Anexos TT e UU. |
| | Alto Grau | 0 | 5 | 13 | 9 | 1 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 0 | 6 | 20 | 17 | 4 | 0,2 6 | Não houve associação entre os vasos sanguíneos na interface e o infiltrado inflamatório portal/septal. Vide Anexos VV e WW. |
| | Alto Grau | 0 | 6 | 11 | 8 | 0 | | |

Tabela 15 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e atividade periportal/perisseptal

| | | Atividade periportal/perisseptal | | | | | | |
|---|-------------------|----------------------------------|---|----|----|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 5 | 2 | 14 | 22 | 1 | 0,16 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos na interface e a atividade periportal /perisseptal. Vide Anexos XX e YY. |
| | Alto Grau | 3 | 6 | 9 | 9 | 1 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 4 | 5 | 15 | 21 | 2 | 0,46 | Não houve associação entre os vasos sanguíneos na interface e a atividade periportal/perisseptal. Vide Anexos ZZ e AAA. |
| | Alto Grau | 4 | 3 | 8 | 10 | 0 | | |

Tabela 16 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e atividade parenquimatosa

| | | Atividade parenquimatosa | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------------|----|----|---|---|------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 1 | 16 | 18 | 8 | 1 | 0,34 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos na interface e a atividade parenquimatosa. Vide Anexos BBB e CCC. |
| | Alto Grau | 2 | 12 | 11 | 3 | 0 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 3 | 15 | 21 | 7 | 1 | 0,26 | Não houve associação entre os vasos sanguíneos na interface e a atividade parenquimatosa. Vide Anexos DDD e EEE. |
| | Alto Grau | 0 | 13 | 8 | 4 | 0 | | |

4.4.4.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos na interface e lesões associadas à doença gordurosa do fígado

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos na interface graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à doença gordurosa do fígado estão expostas nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e esteatose

| | | Esteatose | | | | p | Observação |
|---|-------------------|-----------|----|---|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 14 | 17 | 9 | 4 | 0,67 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos na interface e a esteatose. Vide Anexos FFF e GGG. |
| | Alto Grau | 11 | 10 | 5 | 2 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 15 | 19 | 9 | 4 | 0,97 | A quantidade de casos com muitos vasos ou com poucos vasos sanguíneos na interface não se mostrou relacionada à presença ou aos graus de esteatose. Vide Anexos HHH e III. |
| | Alto Grau | 10 | 8 | 5 | 2 | | |

Tabela 18 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e esteato-hepatite

| | | Esteato-hepatite | | | |
|---|-------------------|------------------|----------|------|---|
| | | Ausente | Presente | p | Observação |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 32 | 22 | 0,57 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos na interface e a esteato-hepatite. Vide Anexos JJJ e KKK. |
| | Alto Grau | 22 | 6 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 34 | 13 | 0,47 | Assim como verificado com relação à esteatose, a quantidade de casos com muitos vasos ou com poucos vasos sanguíneos na interface não se mostrou relacionada à presença de esteato-hepatite. Vide Anexos LLL e MMM. |
| | Alto Grau | 20 | 5 | | |

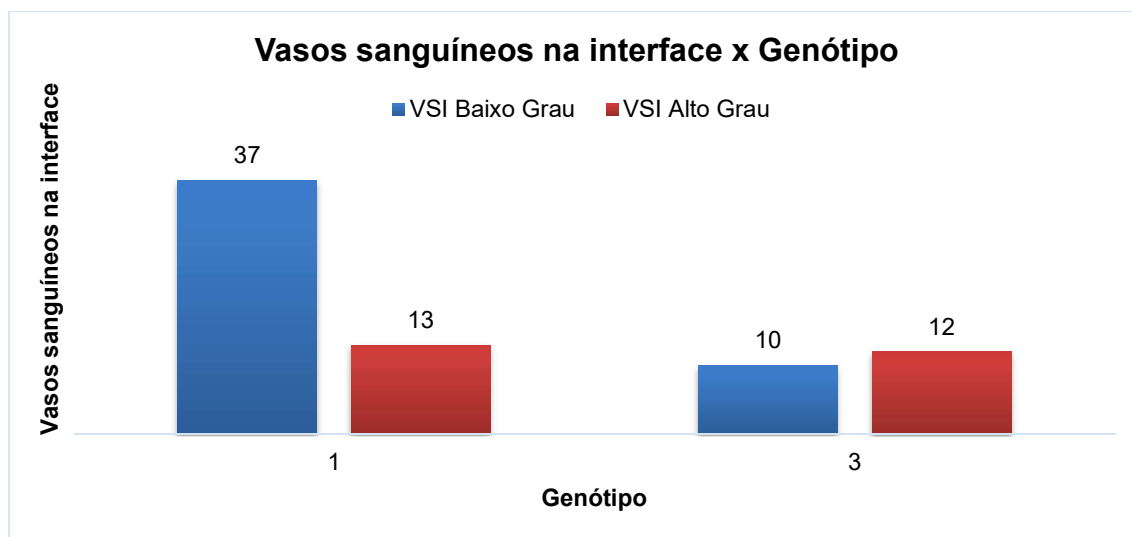
4.4.4.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos na interface e o genótipo do VHC

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e o genótipo está exposto na tabela 19 e gráfico 13.

Tabela 19 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos na interface e genótipo

| | | Genótipo | | | |
|---|-------------------|----------|----|------|---|
| | | 1 | 3 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos na interface (BSI) | Baixo Grau | 30 | 14 | 0,77 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos na interface e o genótipo. Vide Anexos NNN e OOO. |
| | Alto Grau | 20 | 8 | | |
| Vasos sanguíneos na interface (VSI) | Baixo Grau | 37 | 10 | 0,01 | Vide gráfico 13 |
| | Alto Grau | 13 | 12 | | |

Gráfico 13 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme genótipo



A quantidade de casos com vasos sanguíneos na interface mostrou-se significativamente maior no grupo de casos com genótipo 3.

4.4.5. Comparação entre os valores quantitativos de brotos e vasos sanguíneos no parênquima

As comparações dos valores quantitativos entre os brotos sanguíneos no parênquima e vasos sanguíneos no parênquima, estão expostas na tabela 20. Vale repetir que no presente estudo não identificamos a presença de vasos muscularizados no parênquima.

Tabela 20 - Comparação entre os valores de brotos sanguíneos no parênquima e vasos sanguíneos no parênquima

| | | Brotos sanguíneos no parênquima | | |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| | | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | Total Geral |
| Vasos sanguíneos no parênquima | VSPA Baixo Grau | 37 | 0 | 37 |
| | VSPA Alto Grau | 5 | 30 | 35 |
| | Total Geral | 42 | 30 | 72 |

p<0,01

Nota-se em geral concordância no comportamento da formação de brotos e de vasos sanguíneos bem delineados (capilarização focal) nos sinusóides, notando-se, entretanto, 5 casos em que vasos bem constituídos estiveram desacompanhados do aumento do contingente de brotos endoteliais.

4.4.6. Análise comparativa entre a distribuição das variáveis imuno-histoquímicas no parênquima e lesões associadas à hepatite C crônica

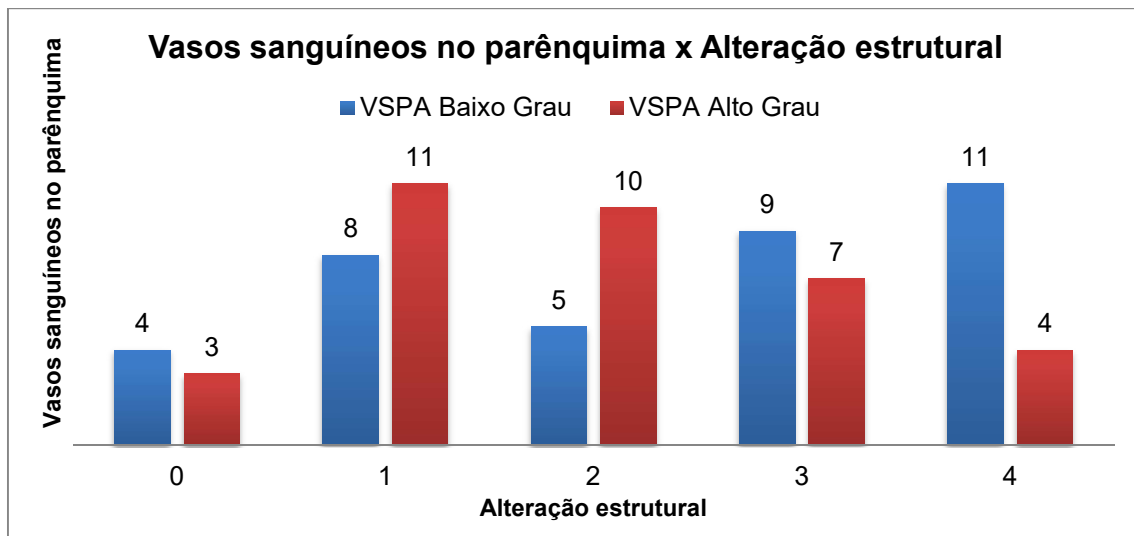
4.4.6.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos no parênquima e lesões associadas à hepatite C crônica

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos no parênquima graduados em baixo e alto grau e os critérios histológicos estão expostas nas tabelas 21, 22, 23 e 24 e gráficos 14 e 15.

Tabela 21 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e alteração estrutural

| | | Alteração estrutural | | | | | | |
|---|-------------------|----------------------|----|----|----|----|------|---|
| | | F0 | F1 | F2 | F3 | F4 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 3 | 14 | 9 | 8 | 8 | 0,31 | Os presentes achados indicam que ainda que a proporção casos com maior contingente de brotos sanguíneos no parênquima tenha sido maior nos casos F3 e F4 (15/31) do que nos casos F0-F2 (15/41) tais valores não se mostraram significativos. Vide Anexo PPP e QQQ. |
| | Alto Grau | 4 | 5 | 6 | 8 | 7 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 4 | 8 | 5 | 9 | 11 | 0,05 | Vide gráfico 14. |
| | Alto Grau | 3 | 11 | 10 | 7 | 4 | | |

Gráfico 14 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais



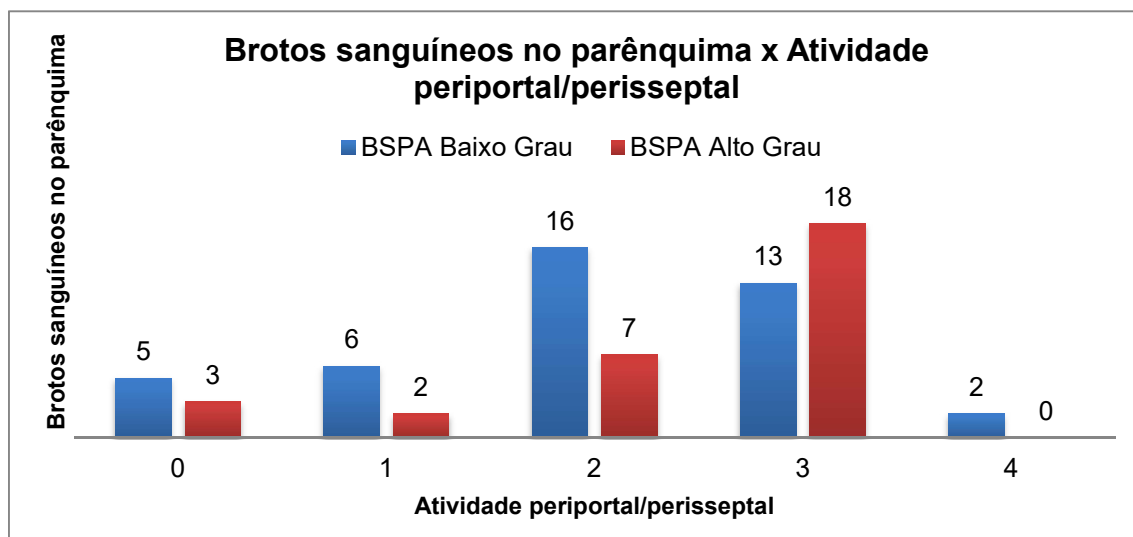
Os presentes achados mostram tendência de aumento da proporção de de casos com formação de vasos sanguíneos completos no parênquima à medida que as alterações estruturais progrediram de F0 até F2 e sua redução nas fases avançadas F3 e F4.

Tabela 22 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e infiltrado inflamatório portal/septal

| | | Infiltrado inflamatório portal/septal | | | | | | |
|---|-------------------|---------------------------------------|---|----|----|---|------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 0 | 8 | 19 | 12 | 3 | 0,35 | Apesar do número de casos com muitos brotos sanguíneos no parênquima ter aumentado, não houve associação com o infiltrado inflamatório portal/septal. Vide Anexo RRR e SSS. |
| | Alto Grau | 0 | 4 | 12 | 13 | 1 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 0 | 9 | 15 | 10 | 3 | 0,36 | Apesar de aparente incremento na quantidade de casos com alto grau de formação de vasos sanguíneos no parênquima na transição entre os graus 2 e 3, tal relação não mostrou qualquer significância estatística. Vide Anexo TTT e UUU. |
| | Alto Grau | 0 | 3 | 16 | 15 | 1 | | |

Tabela 23 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e atividade periportal/perisseptal

| | | Atividade periportal/perisseptal | | | | | | |
|---|-------------------|----------------------------------|---|----|----|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 5 | 6 | 16 | 12 | 2 | 0,04 | Vide gráfico 15. |
| | Alto Grau | 3 | 2 | 7 | 18 | 0 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 6 | 4 | 9 | 16 | 2 | 0,62 | A formação de vasos sanguíneos completos no parênquima não apresentou relação com o grau de atividade necroinflamatória de interface. Vide Anexos VVV e WWW. |
| | Alto Grau | 2 | 4 | 14 | 15 | 0 | | |

Gráfico 15 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal

A formação de brotos sanguíneos no parênquima mostrou-se significativamente relacionada ao grau de atividade necroinflamatória de interface, sendo evidente o incremento detectado na transição de atividade moderada (grau 2) para a intensa (grau 3).

Tabela 24 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e atividade parenquimatosa

| | | Atividade parenquimatosa | | | | | p | Observação |
|---|-------------------|--------------------------|----|----|---|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 3 | 18 | 14 | 6 | 1 | 0,15 | Houve aumento na quantidade de brotos sanguíneos no parênquima entre o grau 2 e 3, porém na análise agrupada não houve associação com a atividade parenquimatosa. Vide Anexos XXX e YYY. |
| | Alto Grau | 0 | 10 | 15 | 5 | 0 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 1 | 14 | 15 | 6 | 1 | 0,65 | Não foi constatada qualquer relação significativa entre a formação de vasos sanguíneos no parênquima e a atividade necroinflamatória parenquimatosa. Vide Anexos ZZZ e AAAA. |
| | Alto Grau | 2 | 14 | 14 | 5 | 0 | | |

4.4.6.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos portais e lesões associadas à doença gordurosa do fígado

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos no parênquima graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à doença gordurosa do fígado estão expostas nas tabelas 25 e 26.

Tabela 25 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e esteatose

| | | Esteatose | | | | | |
|---|-------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | p | Observação |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 18 | 15 | 6 | 3 | 0,15 | Apesar de existir aumento na quantidade de brotos sanguíneos no parênquima conforme o grau de esteatose aumenta, tal relação não atingiu significância estatística. Vide Anexos BBBB e CCCC. |
| | Alto Grau | 7 | 12 | 8 | 3 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 13 | 11 | 9 | 4 | 0,15 | Não foi observada qualquer relação entre esteatose e a formação de vasos sanguíneos no parênquima. Vide Anexos DDDD e EEEE. |
| | Alto Grau | 12 | 16 | 5 | 2 | | |

Tabela 26 - Distribuição do perfil de vasos sanguíneos no parênquima e esteato-hepatite

| | | Esteato-hepatite | | | |
|---|-------------------|-------------------------|-----------------|----------|---|
| | | Ausente | Presente | p | Observação |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 34 | 8 | 0,16 | A quantidade de casos com muitos brotos ou com poucos brotos sanguíneos no parênquima não se mostrou relacionada à presença de esteato-hepatite. Vide Anexos FFFF e GGGG. |
| | Alto Grau | 20 | 10 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 25 | 12 | 0,13 | Não houve associação dos vasos sanguíneos no parênquima com a esteato-hepatite. Vide Anexos HHHH e IIII. |
| | Alto Grau | 29 | 6 | | |

4.4.6.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos no parênquima e o genótipo do VHC

A distribuição dos brotos e vasos sanguíneos no parênquima graduados em baixo e alto grau e o genótipo está exposto na tabela 27.

Tabela 27 - Distribuição do perfil de brotos e vasos sanguíneos no parênquima e genótipo

| | | Genótipo | | | Observação |
|---|-------------------|----------|----|------|--|
| | | 1 | 3 | p | |
| Brotos sanguíneos no parênquima (BSPA) | Baixo Grau | 29 | 13 | 0,93 | Não houve associação entre os brotos sanguíneos no parênquima e os genótipos. Vide Anexos JJJJ e KKKK. |
| | Alto Grau | 21 | 9 | | |
| Vasos sanguíneos no parênquima (VSPA) | Baixo Grau | 27 | 10 | 0,50 | Ainda que os pacientes infectados pelo genótipo 3 do VHC tenham apresentado maior proporção de casos com alto grau de vasos sanguíneos no parênquima, tal diferença não mostrou qualquer tendência à significância estatística. Vide Anexos LLLL e MMMM. |
| | Alto Grau | 23 | 12 | | |

4.5. VASOS LINFÁTICOS

4.5.1. Distribuição dos valores quantitativos de brotos e vasos marcados pela reatividade de seu endotélio para podoplanina

A pesquisa da podoplanina expressa nos vasos linfáticos permitiu identificar células endoteliais formando brotos ou vasos linfáticos nos espaços porta.

Devido ao fato de o corte de um dos casos não apresentar espaços-porta, o número de casos para a expressão da podoplanina no endotélio linfático foi 71.

A distribuição dos valores obtidos com a contagem de brotos e vasos linfáticos tanto nos espaços-porta como na interface em cada um dos 71 casos está apresentada nos Anexos E e F. Os Anexos O, P, Q e R apresentam as medianas das médias dessas positivities, dividindo assim os casos em que cada marcador foi graduado como “baixo grau” e “alto grau”.

Assim, sendo 2 a mediana das médias do número de brotos linfáticos portais (BLP), em 40 casos o valor de brotos linfáticos portais foi classificado como de baixo grau e os demais 31 como de alto grau.

Com a mediana das médias dos vasos linfáticos portais (VLP) sendo 7, 39 casos foram classificados como baixo grau e 32 casos como alto grau.

A pesquisa de brotos linfáticos na interface (BLI) resultou negativa em todos os 71 casos, sendo, portanto, zero sua mediana, o que impede sua análise comparativa com as demais variáveis imuno-histoquímicas e com os critérios histológicos.

Em relação aos vasos linfáticos na interface (VLI), a mediana das médias foi zero, portanto, 69 casos foram classificados como baixo grau e 2 casos como alto grau. Tal distribuição impede análise estatística comparando esta variável com as demais. Merece destaque apenas o fato de estes dois casos também apresentarem alto índice de vasos linfáticos portais, sendo suas alterações estruturais classificadas como F0 (1 caso) e F3 (1 caso).

A pesquisa de brotos linfáticos no parênquima (BLPA) resultou negativa em todos os 71 casos, sendo, portanto, zero sua mediana, o que impede sua análise comparativa com as demais variáveis imuno-histoquímicas e com os critérios histológicos.

A pesquisa de vasos linfáticos no parênquima (VLPA) resultou negativa em todos os 71 casos, sendo, portanto, zero sua mediana, o que impede sua análise comparativa com as demais variáveis imuno-histoquímicas e com os critérios histológicos.

4.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES QUANTITATIVOS DOS VASOS LINFÁTICOS

4.6.1. Comparação entre os valores quantitativos de brotos e vasos linfáticos portais

A comparação dos valores quantitativos entre os brotos linfáticos portais e vasos linfáticos portais, estão na tabela 28.

Tabela 28 - Comparação entre os valores de brotos linfáticos portais e vasos linfáticos portais

| | | Brotos linfáticos portais | | | p<0,01 |
|--------------------------|----------------|---------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | BLP Baixo Grau | BLP Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos linfáticos portais | VLP Baixo Grau | 39 | 0 | 39 | |
| | VLP Alto Grau | 1 | 31 | 32 | |
| Total Geral | | 40 | 31 | 71 | |

Com exceção de um caso, a distribuição entre os padrões de brotos e de vasos linfáticos nos espaços porta foi praticamente idêntica, mostrando a relação direta entre os dois tipos de achado.

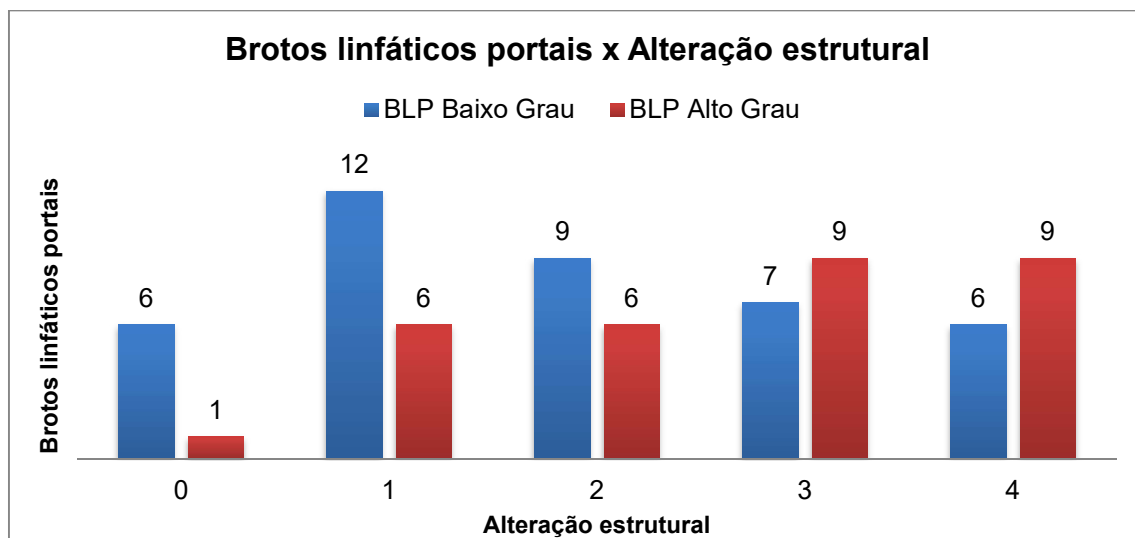
4.6.2. Análise comparativa entre a distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e lesões histológicas

4.6.2.1. Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e lesões associadas à hepatite C crônica

A distribuição dos brotos e vasos linfáticos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à hepatite C estão expostas nas tabelas 29, 30, 31 e 32 e gráficos 16 a 21.

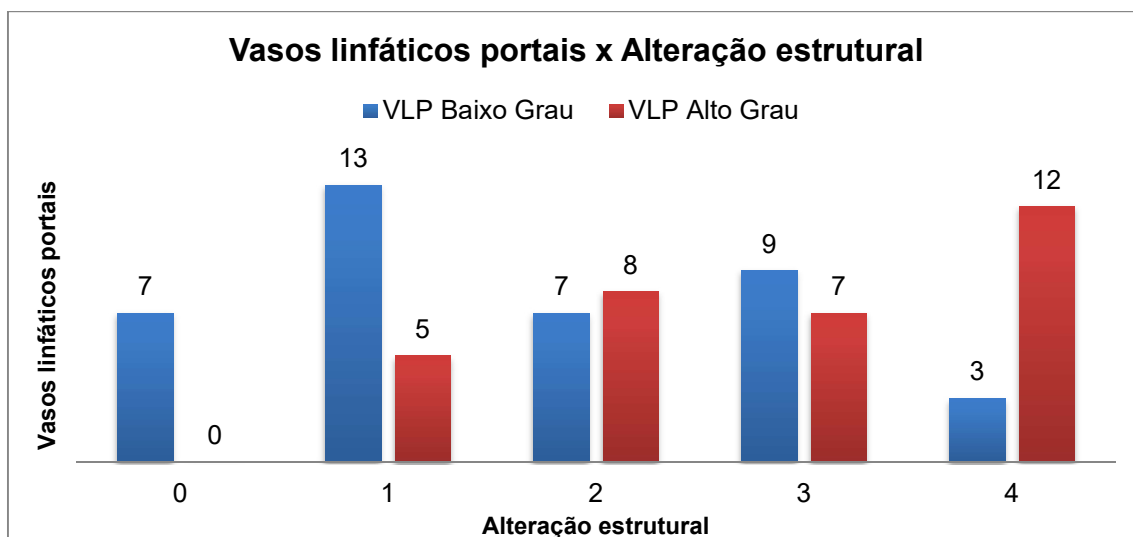
Tabela 29 - Distribuição do perfil de vasos linfáticos portais e alteração estrutural

| | | Alteração estrutural | | | | | p | Observação |
|--|-------------------|----------------------|----|----|----|----|------|-----------------|
| | | F0 | F1 | F2 | F3 | F4 | | |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 6 | 12 | 9 | 7 | 6 | 0,03 | Vide gráfico 16 |
| | Alto Grau | 1 | 6 | 6 | 9 | 9 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 7 | 13 | 7 | 9 | 3 | 0,01 | Vide gráfico 17 |
| | Alto Grau | 0 | 5 | 8 | 7 | 12 | | |

Gráfico 16 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de alterações estruturais

A quantidade de casos com muitos brotos linfáticos portais mostrou aumento à medida que progrediram as alterações estruturais. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de aumento do dano estrutural, sugerindo ativação precoce e mantida da linfangiogênese portal.

Gráfico 17 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de alterações estruturais

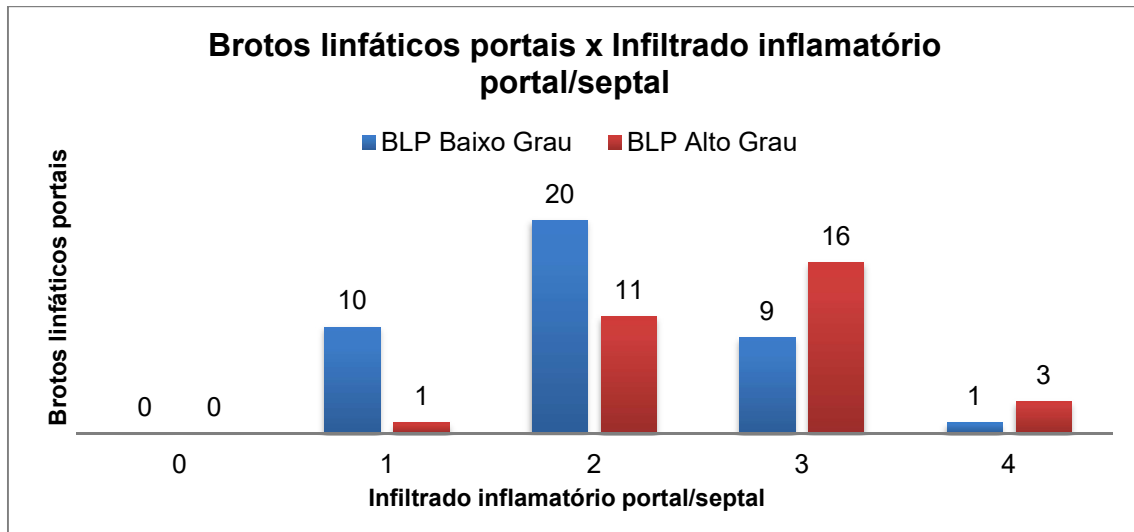


A quantidade de casos com muitos vasos linfáticos portais mostrou-se significativamente maior no conjunto de casos com maiores alterações estruturais, ressaltando-se aparente descontinuidade de tal incremento entre os casos com alterações estruturais grau 3.

Tabela 30 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e infiltrado inflamatório portal/septal

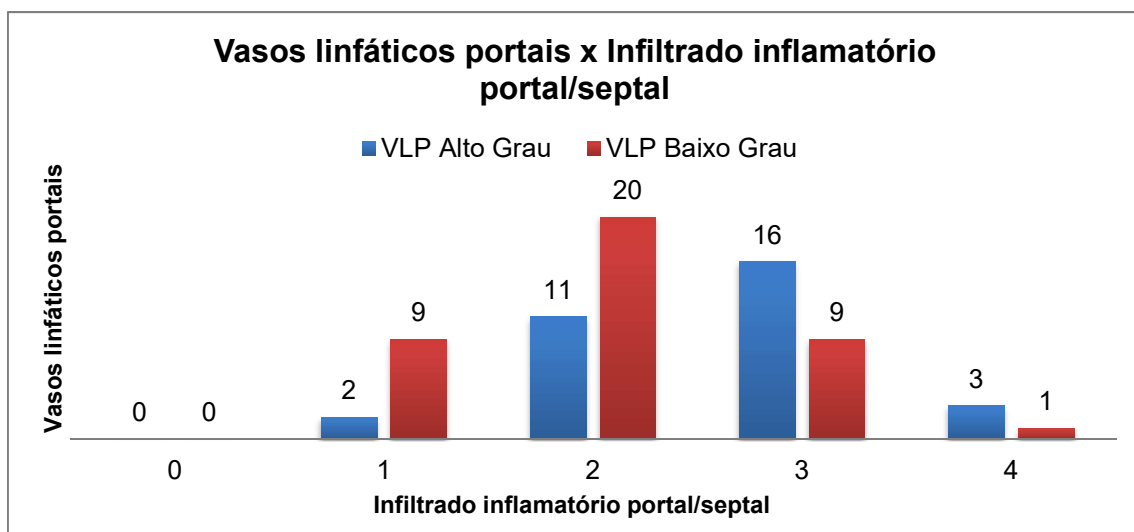
| | | Infiltrado inflamatório portal/septal | | | | | | |
|--|-------------------|---------------------------------------|----|----|----|---|-------|-----------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 0 | 10 | 20 | 9 | 1 | <0,01 | Vide gráfico 18 |
| | Alto Grau | 0 | 1 | 11 | 16 | 3 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 0 | 9 | 20 | 9 | 1 | 0,01 | Vide gráfico 19 |
| | Alto Grau | 0 | 2 | 11 | 16 | 3 | | |

Gráfico 18 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de infiltrado inflamatório portal/perisseptal



A quantidade de casos com muitos brotos linfáticos portais mostrou aumento à medida que progrediram as alterações estruturais. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de aumento do infiltrado inflamatório portal, sugerindo relação direta entre cada grau de atividade inflamatória e a linfangiogênese portal.

Gráfico 19 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de infiltrado inflamatório portal/septal



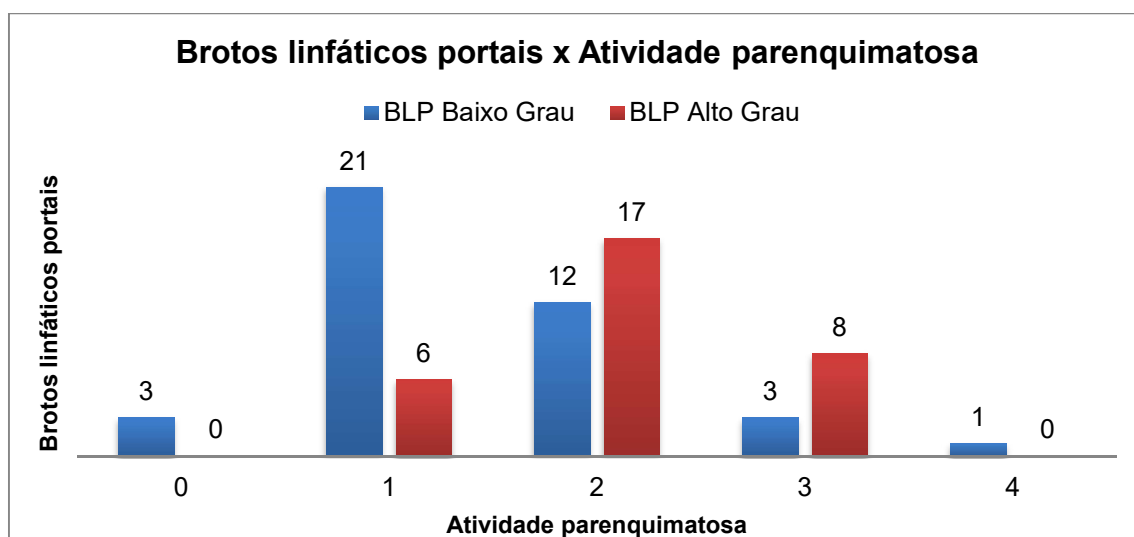
A quantidade de casos com muitos vasos linfáticos portais mostrou aumento à medida que progrediram as alterações estruturais. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de aumento do infiltrado inflamatório portal, sugerindo relação direta entre cada grau de atividade inflamatória e a linfangiogênese portal.

Tabela 31 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e atividade periportal/perisseptal

| | | Atividade periportal/perisseptal | | | | | | |
|--|-------------------|----------------------------------|---|----|----|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 8 | 6 | 10 | 16 | 0 | 0,21 | Não detectamos diferenças significativas na quantidade de casos com muitos brotos linfáticos portais conforme a atividade periportal/perisseptal. Fica, entretanto, a observação de aumento marcante do número de casos com muitos brotos linfáticos portais a partir da atividade necro-inflamatória grau 2. Vide Anexos NNNN e OOOO. |
| | Alto Grau | 0 | 1 | 13 | 15 | 2 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 8 | 4 | 12 | 14 | 1 | 0,13 | Não detectamos diferenças significativas na quantidade de casos com muitos vasos linfáticos portais conforme a atividade periportal/perisseptal. Fica, entretanto, a observação do aumento marcante do número de casos com muitos vasos linfáticos portais entre os graus 2 e 3 de atividade necro-inflamatória. Importa também realçar que só dois casos tiveram atividade necro-inflamatória periportal grau 4. Vide Anexos PPPP e QQQQ. |
| | Alto Grau | 0 | 3 | 11 | 17 | 1 | | |

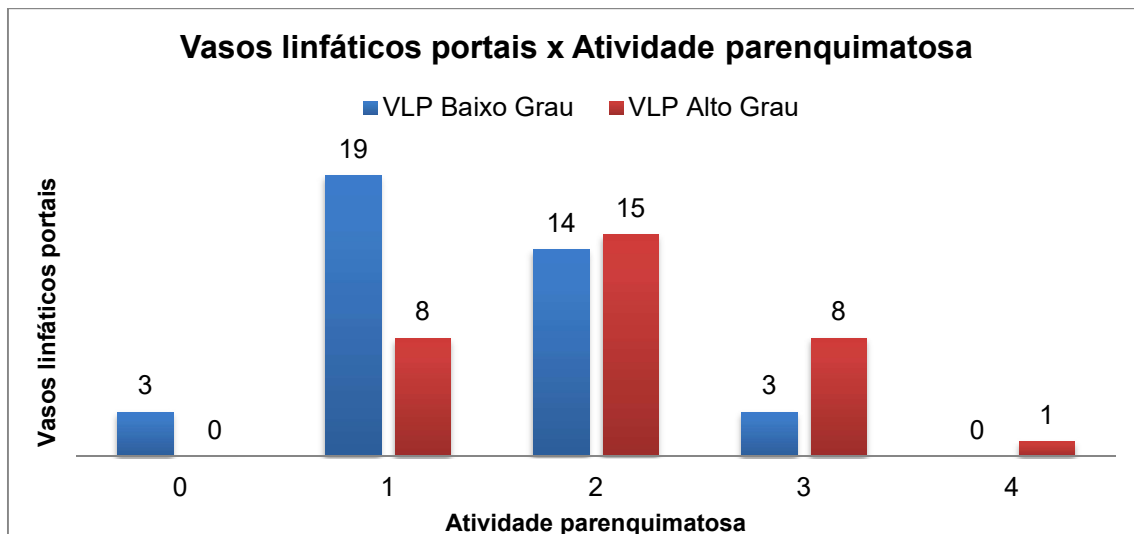
Tabela 32 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e atividade parenquimatosa

| | | Atividade parenquimatosa | | | | | | |
|--|-------------------|--------------------------|----|----|---|---|-------|-----------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 3 | 21 | 12 | 3 | 1 | <0,01 | Vide gráfico 20 |
| | Alto Grau | 0 | 6 | 17 | 8 | 0 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 3 | 19 | 14 | 3 | 1 | <0,01 | Vide gráfico 21 |
| | Alto Grau | 0 | 8 | 15 | 8 | 1 | | |

Gráfico 20 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de atividade parenquimatosa

Ressalvando-se a presença de apenas um caso com atividade inflamatória grau 4 no parênquima, a quantidade de casos com muitos brotos linfáticos portais mostrou aumento significativo à medida que aumentou a atividade necro-inflamatória parenquimatosa. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de atividade parenquimatosa. Em especial, a transição da atividade parenquimatosa grau 1 para 2, muito valorizada na histopatologia, mostrou-se acompanhada de maior ativação da linfangiogênese portal.

Gráfico 21 - Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de atividade parenquimatosa



Ressalvando-se a presença de apenas um caso com atividade inflamatória grau 4 no parênquima, a quantidade de casos com muitos vasos linfáticos portais mostrou aumento significativo à medida que aumentou a atividade necro-inflamatória parenquimatosa. Tal aumento mostrou-se significativo na análise agrupada, sendo também aparente que o aumento ocorreu em cada grau de atividade parenquimatosa.

4.6.2.2. Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e lesões associadas à doença gordurosa do fígado

A distribuição dos brotos e vasos linfáticos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e as lesões associadas à doença gordurosa do fígado estão expostas nas tabelas 33 e 34.

Tabela 33 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e esteatose

| | | Esteatose | | | | p | Observação |
|--|-------------------|-----------|----|---|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 15 | 13 | 8 | 4 | 0,69 | A quantidade de casos com muitos ou poucos brotos linfáticos portais não se mostrou relacionada à presença ou aos graus de esteatose. Vide Anexos RRRR e SSSS. |
| | Alto Grau | 10 | 13 | 6 | 2 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 19 | 11 | 7 | 2 | 0,29 | Ainda que a observação do gráfico SS e da tabela 3F mostre aparente aumento do número de casos com muitos vasos linfáticos portais no conjunto de casos com maior esteatose hepática (g.2 ou g.3), tal diferença não atingiu significância estatística. Vide Anexos TTTT e UUUU. |
| | Alto Grau | 6 | 15 | 7 | 4 | | |

Tabela 34 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e esteato-hepatite

| | | Esteato-hepatite | | p | Observação |
|--|-------------------|------------------|----------|------|---|
| | | Ausente | Presente | | |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 32 | 8 | 0,37 | A quantidade de casos com muitos ou poucos brotos linfáticos portais não se mostrou relacionada à presença de esteato-hepatite. Vide Anexos VVVV e WWWW. |
| | Alto Grau | 22 | 9 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 32 | 7 | 0,19 | Ainda que a observação do gráfico XXXX e da tabela YYYY mostre aparente aumento do número de casos com muitos vasos linfáticos portais no conjunto de casos apresentando esteato-hepatite, tal diferença não atingiu significância estatística. |
| | Alto Grau | 22 | 10 | | |

4.6.2.3. Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e o genótipo do VHC

A distribuição dos brotos e vasos linfáticos nos espaços porta graduados em baixo e alto grau e o genótipo está exposto na tabela 35.

Tabela 35 - Distribuição do perfil de brotos e vasos linfáticos portais e genótipo

| | | Genótipo | | | Observação |
|--|-------------------|----------|----|------|--|
| | | 1 | 3 | p | |
| Brotos linfáticos portais (BLP) | Baixo Grau | 25 | 15 | 0,17 | Apesar da proporção de casos com maior quantidade de brotos linfáticos portais ser aparentemente maior em pacientes infectados pelo VHC genótipo 1, tal diferença não se mostrou significativa estatisticamente. Vide Anexos ZZZZ e AAAAA. |
| | Alto Grau | 24 | 7 | | |
| Vasos linfáticos portais (VLP) | Baixo Grau | 28 | 11 | 0,57 | Apesar da proporção de casos com maior quantidade de vasos linfáticos portais ser aparentemente maior em pacientes infectados pelo VHC genótipo 3, tal diferença não se mostrou significativa estatisticamente. Vide Anexos BBBBB e CCCCC. |
| | Alto Grau | 21 | 11 | | |

4.7. DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES QUANTITATIVOS DOS GENÓTIPOS

4.7.1. Análise comparativa entre os genótipos e lesões associadas à hepatite C crônica

4.7.1.1. Distribuição dos genótipos e lesões associadas à hepatite C crônica

A distribuição dos genótipos e as lesões associadas à hepatite C estão expostas nas tabelas 36,37,38 e 39.

Tabela 36 - Distribuição dos genótipos e alteração estrutural

| | | Alteração estrutural | | | | | | |
|----------|---|----------------------|----|----|----|----|------|---|
| | | F0 | F1 | F2 | F3 | F4 | p | Observação |
| Genótipo | 1 | 7 | 11 | 8 | 12 | 12 | 0,20 | Os grupos de pacientes infectados pelos genótipos 1 e 3 não mostraram diferença significativa quanto à distribuição dos graus de alteração estrutural. Vide Anexos DDDDD e EEEEE. |
| | 3 | 0 | 8 | 7 | 4 | 3 | | |

Tabela 37 - Distribuição dos genótipos e infiltrado inflamatório portal/septal

| | | Infiltrado inflamatório portal/septal | | | | | | |
|----------|---|---------------------------------------|---|----|----|---|------|--|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Genótipo | 1 | 0 | 6 | 21 | 19 | 4 | 0,13 | Os grupos de pacientes infectados pelos genótipos 1 e 3 não mostraram diferença significativa quanto à distribuição dos graus de infiltrado inflamatório portal / septal. Vide Anexos FFFFF e GGGGG. |
| | 3 | 0 | 6 | 10 | 6 | 0 | | |

Tabela 38 - Distribuição dos genótipos e atividade periportal/perisseptal

| | | Atividade periportal/perisseptal | | | | | | |
|----------|---|----------------------------------|---|----|----|---|------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Genótipo | 1 | 6 | 4 | 17 | 21 | 2 | 0,96 | Os grupos de pacientes infectados pelos genótipos 1 e 3 não mostraram diferença significativa quanto à distribuição dos graus de alteração estrutural. Vide Anexos HHHHH e IIIII. |
| | 3 | 2 | 4 | 6 | 10 | 0 | | |

Tabela 39 - Distribuição dos genótipos e atividade parenquimatosa

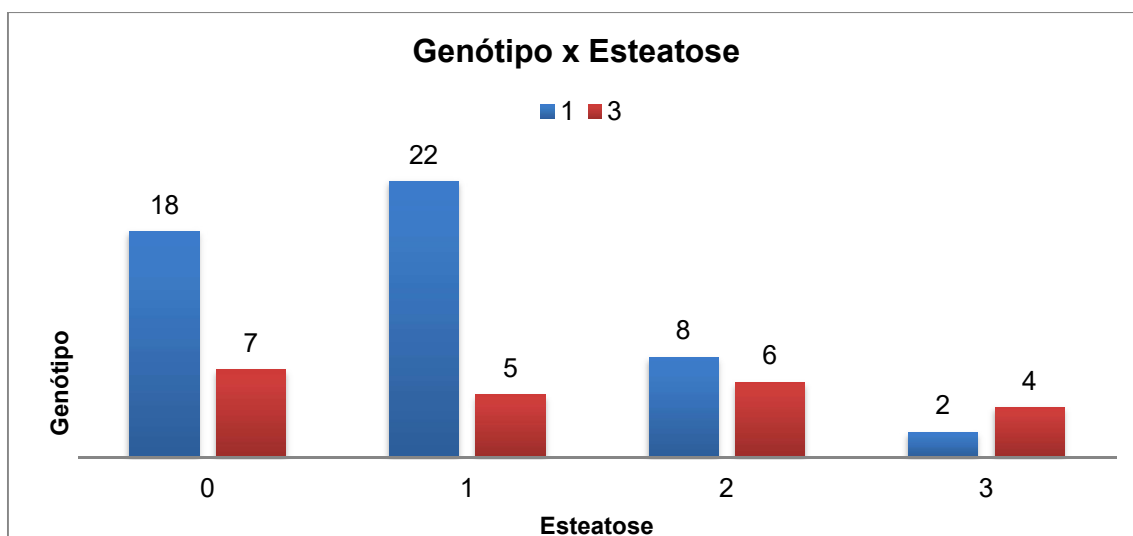
| | | Atividade parenquimatosa | | | | | | |
|----------|---|--------------------------|----|----|---|---|------|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | p | Observação |
| Genótipo | 1 | 3 | 21 | 16 | 9 | 1 | 0,20 | Os grupos de pacientes infectados pelos genótipos 1 e 3 não mostraram diferença significativa quanto à distribuição dos graus de atividade necro-inflamatória no parênquima. Vide Anexos JJJJJ e KKKKK. |
| | 3 | 0 | 7 | 13 | 2 | 0 | | |

4.7.1.2. Distribuição dos genótipos e lesões associadas à doença gordurosa do fígado

A distribuição dos genótipos e as lesões associadas à doença gordurosa do fígado estão expostas nas tabelas 40 e 41 e gráfico 22.

Tabela 40 - Distribuição dos genótipos e esteatose

| | | Esteatose | | | | | |
|----------|---|-----------|---|---|---|------|-----------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | p | Observação |
| Genótipo | 1 | 18 | 2 | 8 | 2 | 0,02 | Vide gráfico 22 |
| | 3 | 7 | 5 | 6 | 4 | | |

Gráfico 22 - Distribuição de casos por genótipo conforme os graus de esteatose

O grupo de pacientes infectados por VHC genótipo 3 apresentou quantidade de casos com esteatose moderada/acentuada (grau 2 ou grau 3) significativamente maior que a encontrada no grupo de casos infectados por VHC genótipo 1.

Tabela 41 - Distribuição dos genótipos e esteato-hepatite

| | Esteato-hepatite | | p | Observação |
|-----------------|------------------|----------|------|---|
| | Ausente | Presente | | |
| Genótipo | 1 | 39 | 0,37 | Ainda que maior proporção de pacientes infectados por VHC genótipo 3 tenha sido diagnosticada com esteato-hepatite, tal diferença não atingiu significância. Vide Anexos LLLLL e MMMMM. |
| | 3 | 15 | | |

5. DISCUSSÃO

Apesar de inúmeros avanços terem sido relatados em estudos sobre hepatite C, principalmente em relação à terapia antiviral, a recente demonstração de persistência de inflamação mesmo em fígados de casos tratados com antivirais de ação direta e com resposta viral sustentada^{98,98} demonstra ser, ainda hoje, muito importante o estudo das implicações biológicas das várias faces da inflamação em Hepatite C, destacando-se entre elas as alterações vasculares, especialmente por sua interação com a fibrose e com a hipertensão portal, conforme recentemente revisto por Zadorozhna et al.¹⁰⁰ Diante do crescente número de estudos publicados sobre as consequências da formação de novos vasos sanguíneos nas lesões hepáticas e da escassez de trabalhos envolvendo a formação de novos vasos linfáticos, o presente estudo transversal retrospectivo realizado em biópsias de fígado visou à caracterização dos aspectos histológicos da lesão hepática pelo VHC e da doença gordurosa relacionados com a vascularização sanguínea e linfática e com o genótipo viral.

5.1. ASPECTOS GERAIS

Desde o isolamento do DNA complementar do vírus da hepatite C (antes chamada de não A-não B) em 1989 por Cho et al.¹⁰¹, houve uma intensa interação entre as pesquisas básicas, translacionais e clínicas. Nos 32 anos desde a descoberta do VHC, podemos observar o avanço nas ferramentas diagnósticas e estratégias de erradicação e controle da doença como, o início do tratamento com interferon, a descoberta de testes sorológicos e virológicos, em paralelo, testes bioquímicos e morfológicos não invasivos para verificar a fibrose e a evolução nos tratamentos com antivirais orais específicos que inibem as proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral.¹⁰²

Apesar dos avanços, no mundo, há milhões de infectados com o vírus da hepatite C. No Brasil, 10.000 novos são notificados casos por ano.⁵⁷ Em se tratando de doença crônica com complicações muito tardias, enquanto a prevalência da infecção por VHC diminui, a previsão é de que a mortalidade secundária pelo VHC continue a crescer nos próximos 20 anos.¹⁰³

De outra parte, uma das doenças hepáticas que está se tornando proeminente é a doença gordurosa hepática não alcóolica, devido a um

aumento na taxa de sobrepeso e obesidade no mundo de 1975 até 2016. A taxa triplicou, acometendo 1,9 bilhão de adultos, mais de 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos e 41 milhões de crianças menores de 5 anos. A doença gordurosa hepática não alcoólica compreende o espectro desde a esteatose, esteato-hepatite até a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. Considerando a importância da obesidade visceral como fator de risco para uma série de complicações, a associação com a infecção pelo VHC deve ser investigada, pois eleva o risco de progressão para as formas graves da doença hepática, inclusive com insuficiência hepática.^{104,105,106}

O vírus da hepatite C é caracterizado por ser hepatotrópico e linfotrópico, causa crioglobulinemia e provoca um estado inflamatório sistêmico, com manifestações extra-hepáticas e correlação com problemas metabólicos (resistência à insulina, diabetes mellitus, esteatose e aumento de risco de doenças vasculares) em decorrência do stress oxidativo. A infecção pelo VHC promove uma cascata inflamatória no fígado, com alterações em macrófagos natural killers e células hepáticas estreladas/miofibroblastos, ativação de receptor toll-like e produção de citocinas pró-inflamatórias.^{102,107,108}

A transmissão pode ser via parenteral e em geral, a infecção aguda é assintomática. Cerca de 60 a 85% evoluem para infecção crônica que, caso não seja erradicada, traz o risco de desenvolvimento de cirrose nos próximos 20 a 30 anos e, posteriormente, de carcinoma hepatocelular.⁵⁷ Em nosso país, dados coletados pelo Ministério da Saúde⁵⁷ mostram que 60% dos casos notificados eram na forma crônica e o maior percentual da fonte de infecção de 2009 a 2018 foi por uso de droga, seguido de transfusão sanguínea e relação sexual. Já em 2019, a proporção da transmissão por relação sexual foi superior a transmissão por uso de drogas e transfusional.

Os genótipos mais representativos do vírus da hepatite C no Brasil são o tipo 1 seguido do tipo 3. Segundo Manns et al.¹⁰⁷, o genótipo influencia no curso da doença e na estratégia terapêutica.^{88,103,109,110,111}

A distribuição etária dos infectados correlaciona-se com a fonte da infecção. Em países cujo uso de drogas injetáveis é um importante fator de risco, a idade de pico de infecção é até 30 anos, devido aos usuários ativos de drogas serem geralmente jovens. Em países onde a doença decorrente de

complicações causadas pelo VHC, a faixa etária de pico de infecção é entre 50 e 60 anos, pois adquiriram a infecção antes dos anos 90, principalmente pessoas que passaram por transfusão de sangue ou administração de fatores de coagulação, até a fase em que o diagnóstico se tornou possível. Em alguns países, o perfil etário é misto por causa da presença de vários fatores de risco.¹⁰⁷ No Brasil, os casos notificados no período de 2008 a 2019, ocorreram na faixa etária acima dos 60 anos.⁵⁷ Nosso estudo teve idade média de 48,7 anos, compreendendo a faixa de 22 a 78 anos, muito similar ao referido por Manns et al.¹⁰⁷ e pelos dados do Ministério da Saúde⁵⁸ do Brasil.

Com o surgimento dos medicamentos antivirais de ação direta, mais de 90 % dos infectados submetidos a tratamento de curta duração de 12 ou 24 semanas apresentam resposta virológica sustentada e uma tolerabilidade satisfatória.^{111,112,113} Contudo, ainda há questões não resolvidas, envolvendo a baixa efetividade no tratamento de algumas populações que apresentam dificuldade de cura, incluindo pacientes com infecção pelo genótipo 3 do vírus da hepatite C, carcinoma hepatocelular ativo, descompensação hepática grave, e aqueles que tiveram múltiplas falhas no tratamento com DAA.^{107,111}

A eliminação do vírus ajuda a frear o processo de evolução da doença hepática. Entretanto, em paciente com maior comprometimento hepático (cirroses avançadas), a chance de regressão da fibrose é menor, além de não eliminar o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, permanecendo, ainda, a polêmica quanto ao aparente aumento do risco de carcinoma precoce recorrente. Cumpre lembrar que a cirrose pelo VHC, associada ou não ao carcinoma hepatocelular, é, ainda hoje, a principal indicação para transplante de fígado.^{57,107,111,114,115}

Apesar do diagnóstico, eficácia e tolerabilidade do tratamento terem grande contribuição, menos de 1% das pessoas infectadas pelo VHC foram tratadas e a maioria nem sabe ser portadora daquela que continua sendo a maior causa de doença crônica hepática.^{102,107}

O presente estudo mostrou predominância de sexo feminino, diferindo, neste aspecto, dos achados mais relatados na população brasileira; dados publicados no Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde de 2020⁵⁷, a análise dos casos notificados de hepatite C desde 1999, mostrou que a taxa

de detecção é predominantemente no sexo masculino com 57,6% do total de 253.307 casos. Ressalte-se, entretanto, que aquele mesmo Boletim relata aumento progressivo no número de casos de VHC em pacientes do sexo feminino ao longo dos anos. Em 1999, a razão de sexos era de 2,2, passando para 1,4 em 2008 e para 1,3 no ano de 2019.⁵⁷

5.2. HISTOPATOLOGIA – ASPECTOS GERAIS

O estudo microscópico da amostra de tecido hepática obtida mediante punção- biópsia por agulha, apesar dos demais avanços, ainda merece importantes considerações, pois além do diagnóstico, traz inúmeras informações importantes como a identificação de doenças co-existentes, o grau de atividade necro-inflamatória e o comprometimento (estadiamento) da arquitetura hepática. Permite ainda a identificação de alterações que servem como marcadores etiológicos como a presença de folículos linfoides portais e esteatose.^{26,116,117}

Nesta Dissertação, efetuamos a análise semi-quantitativa de alterações histológicas relacionadas a etiologia, o grau de atividade necro-inflamatória e o comprometimento arquitetural.

5.2.1. Estadiamento das lesões da arquitetura hepática

Seguindo algumas das classificações mais adotadas para análise do Estadiamento das lesões da arquitetura hepática (“estadiamento da fibrose”) de F0 (arquitetura preservada) até F4 (cirrose plenamente estabelecida)^{93,116,118} verificamos que os 72 casos deste estudo refletem o espectro completo das variações histológicas da hepatite crônica C desde formas leves (F0-F1-F2) representando 57% de nossos casos até o padrão de cirrose (F3-F4) representando 43%, de modo a permitir que o objetivo de analisar a evolução da neoformação de vasos sanguíneos e linfáticos ao longo da progressão das lesões hepáticas pudesse ser atingido.

Esta distribuição é similar à relatada por Guido et al.¹¹⁷ que, usando a classificação de Ishak (estádios 0-6) observaram que a maior parte dos casos tinham fibrose leve 1-2 (31 casos), seguido de fibrose moderada 3-4 (7

casos) e fibrose avançada 5-6 (2 casos) do total de 40 biópsias de fígado com hepatite crônica recorrente após transplante. Wong et al.¹¹⁹ também utilizaram a classificação de Ishak e encontraram 65% dos casos com fibrose leve (0,1,2).

Outros estudos concentraram-se em casuística com distribuição diferente dos diversos estádios. Assim, Petrescu et al.¹²⁰ encontraram fibrose portal em todos os 56 pacientes e Kukla et al.¹²¹, encontraram 90% dos 40 pacientes não obesos com hepatite C crônica com fibrose leve, distribuídos em 3 pacientes que não possuíam fibrose (7,5%), 19 com fibrose estágio 1 (47,5%), 14 com fibrose estágio 2 (35%) e 4 com fibrose estágio 3 ou cirrose (10%). Assim também, no estudo transversal feito por Castelo et al.¹²² em pacientes com cirrose hepática por VHC genótipo 1 provenientes do sistema de saúde pública brasileira, o estadiamento realizado por imagem mostrou maioria dos casos com graduação de fibrose máxima (F4), seguido pelos graus de fibrose leve (F0-F1) segundo a classificação de METAVIR.

Já no trabalho de Wakamatsu¹²³, seguindo um sistema de “score”, a casuística foi composta de casos com formas mais acentuadas (F3-F4) representando 62% (31 casos) do total de 50 casos. O trabalho de Alves¹²⁴, conforme parâmetros recomendados pela Associação Internacional para o Estudo das Doenças do fígado de 1994, dos 50 casos que compuseram a casuística, 19 casos tinham histologia normal ou hepatite crônica ativa sem esboços nodulares (38%) e 31 casos estavam em transformação nodular ou com cirrose (52%).

Entretanto, ressalte-se que todos esses estudos, assim como esta nossa Dissertação, não selecionaram grupos baseados no estágio da doença ou associando com os informes clínicos, por isso fornecem apenas uma idéia do que acontece naquele momento em que o paciente foi biopsiado. No plano ideal, para compreender melhor a evolução das alterações histopatológicas ao longo do curso da hepatite C, o mais indicado seriam estudos em biópsias sequenciais. Há trabalhos com esta estratégia, analisando a evolução da fibrose, como o de Mendes et al.¹²⁵ realizado no LIM-14 e, mais recentemente, o de Patel et al.¹²⁶ e Younossi et al.¹⁰⁶ Sendo o interesse principal desta Dissertação o estudo dos microvasos sanguíneos e linfáticos nos diversos estádios da Hepatite C, cumpre relatar que não encontramos na literatura

estudos longitudinais acompanhando a evolução dos microvasos ao longo da progressão da hepatite C.

5.3. MARCADORES DE ATIVIDADE NECRO-INFLAMATÓRIA

5.3.1. Atividade necro-inflamatória portal/septal

No presente estudo, seguindo a proposta de Desmet et al.¹¹⁶ e Gayotto et al.⁹³, realizamos uma análise compartimentalizada da atividade inflamatória, com graduação individualizada da atividade inflamatória nos espaços porta em separado das lesões peri-portais (interface) e das lesões lobulares (parenquimatosas).

Na nossa casuística, o infiltrado inflamatório portal/septal mostrou-se discreto a moderado (0, 1 e 2) em 60% dos casos, refletindo o fato de as hepatites crônicas pelo VHC não atraírem tantos linfócitos para os espaços-porta e para os septos fibrosos como o que ocorre nas hepatites autoimunes. Como já descrito por Gerber¹²⁷ no início dos estudos das hepatites crônicas C, posteriormente por Mosnier¹²⁸, Wakamatsu¹²³ e mais recentemente por Petrescu et al.¹²⁰, em nossa casuística a inflamação portal mostrou predominância de linfócitos misturados com plasmócitos e raros eosinófilos, podendo ser vistos agregados ou mesmo folículos linfóides restritos ao espaço-porta, mesmo em casos sem atividade de interface.

Os resultados obtidos nesse estudo sobre a inflamação portal são similares aos de Bach et al.¹²⁹, que fizeram uma análise comparativa entre hepatite autoimune e hepatite C em amostras obtidas por biópsias hepáticas, onde a maioria das biópsias apresentaram ausência ou inflamação leve na hepatite C, contrastando com a ativação de linfócitos e plasmócitos muito maior nas hepatites autoimunes.

Wong et al.¹¹⁹ também observaram que 177 amostras das 200 biópsias hepáticas consecutivas de pacientes com hepatite C crônica foram classificadas como sem inflamação portal (score 0) ou inflamação portal leve, pouco ou em toda área portal (score 1), sendo 23 sem inflamação portal e 107

com inflamação portal leve, em pequenos focos ou em toda área portal. Os agregados linfóides ou folículos nos tratos portais apareceram em 60% (120) das biópsias hepáticas.

5.3.2. Atividade necro-inflamatória periportal/Hepatite de Interface

De acordo com Ishak¹³⁰, hepatite de interface (periportal) é uma das lesões mais importantes das hepatites crônicas, podendo evoluir com dano à placa limitante das células hepáticas, sendo um dos principais marcadores de atividade necro-inflamante de prognóstico.

A atividade de interface não envolve necessariamente todas as áreas portais igualmente em um determinado caso podendo afetar apenas um segmento ou a totalidade de um trato portal. Por este motivo, diante da tentativa de semi quantificação na área periportal neste estudo, deve-se levar em consideração, mesmo de modo semi quantitativo, a proporção de espaços porta atingidos e o perímetro que é efetivamente lesado. A importante variável atividade periportal/perisseptal foi representada nos 72 casos em seus vários graus no presente estudo, notando-se 12 casos (17%) com pouca atividade, 31 casos (43%) com atividade moderada e acentuada (grau 3 e 4) em 33 casos (46%) permitindo assim a comparação dos perfis imuno-histoquímicos referentes aos vasos sanguíneos e linfáticos tanto pelos casos com baixo como com alto grau de hepatite de interface.

Como costuma-se observar em hepatites C crônicas^{119,121,123,124,127,129}, em sua maior parte, os casos aqui estudados apresentaram atividade parenquimatosa grau 1 (39%) ou grau 2 (40%), com lesões mais exuberantes (graus 3 ou 4) observadas em apenas 16% dos casos.

Petrescu et al.¹²⁰ encontraram atividade necro-inflamatória em 100% da casuística e sua difusão e distribuição eram irregulares. Aqueles autores recordam que nas formas leves e moderadas da hepatite, as lesões foram identificadas sem pontos focais isolados, enquanto na forma mais acentuada da doença, a necro-inflamação afetou áreas muito extensas da interface.

A interação entre os linfócitos T e os hepatócitos pode ativar a síntese de colágeno como já havia sido observado por Garcia-Monzon et al.¹³¹, que descreveram uma maior expressão de integrinas $\beta 1$ nos hepatócitos periportais e lobulares do fígado de pacientes com hepatites crônicas virais do que no fígado normal. Os hepatócitos e as células sinusoidais têm capacidade de adesão a diversas proteínas de matriz extracelular. Assim, a alteração da composição fisiológica da matriz extracelular, com o crescimento desordenado dos hepatócitos durante a reparação das células lesadas, a alteração da taxa de células parenquimatosas para células não parenquimatosas e a produção de citocinas por hepatócitos infectados pelo vírus e infiltrado de células T ativadas, em conjunto, estimulam a proliferação fibroblásica e a síntese de colágeno, servindo de base para a fibrose que se observa à histopatologia. Tal acúmulo anormal de proteínas de matriz extracelular nas áreas periportais e a expressão do VCAM-1 nas células sinusoidais observadas na hepatite crônica viral podem ser um forte estímulo para linfócitos infiltrados do fígado, aumentando a proliferação e a motilidade destas células, invadindo assim o parênquima circundante.

Posteriormente, Hassan et al.¹³², realizaram estudo imuno-histoquímico em 23 biópsias hepática com hepatite crônica e descobriram que plasmócitos que infiltram a interface em hepatite crônicas, produzem imunoglobulinas e interleucina-1 e sugeriram que mais adiante atuam, junto com outros mediadores de forma parácrina na indução da síntese de colágeno por hepatócitos adjacentes nestas áreas periportais.

De acordo com Aizawa e Hokari¹³³, os fenômenos auto-imunes são frequentemente encontrados na hepatite C crônica e auto-anticorpos estão presentes em 30% dos doentes. A histopatologia dos casos de hepatite C crônica com características auto-imunes mostra hepatite de interface mais acentuada, infiltração de plasmócitos, e acumulação extensa de linfócitos na região portal e periportal. Os dois casos deste nosso estudo que apresentaram atividade de interface grau 4 poderiam teoricamente corresponder a esta situação de sobreposição da hepatite C com fenômenos autoimunes, mas em se tratando de um trabalho retrospectivo, baseamo-nos na ausência de informe de positividade dos auto-anticorpos na época em que foram efetuadas essas biópsias.

5.3.3. Atividade necro-inflamatória parenquimatosa/intralobular

As lesões intra-lobulares incluem balonização ou retração acidofílica de hepatócitos, podendo ser focais, afetando hepatócitos isolados, ou grupos de hepatócitos, sendo, na hepatite C, infrequente o encontro de necrose hepatocitária mais extensa.¹²⁸

Em nossa casuística, a atividade necro-inflamatória intralobular/parenquimatosa esteve presente em 96% dos casos, com predomínio do grau 2 com 29 casos (40%) seguido de 39% (28 casos) do grau 1. É interessante ressaltar que a lesão lobular grau 3, esteve presente em 11 casos (16%) e apenas 1 caso (1%) teve necrose confluyente extensa/múltipla, confirmada mediante revisão histopatológica por dois observadores (APF e VAFA).

A distribuição das lesões inflamatórias em nossos casos é, em vários aspectos, similar à de outros estudos, com alguma inflamação presente em quase todos os casos, mas com raros casos mostrando lesões parenquimatosas mais exuberantes. Bach et al.¹²⁹, observaram inflamação lobular significativa em 38% dos 50 casos biopsiados no Mount Sinai Hospital, Nova York, com necrose confluyente em apenas 3 casos (6%). Aqueles autores destacam a discrepância da intensidade das lesões com as observadas em hepatites autoimunes, que, em sua série, apresentou inflamação lobular significativa em 76% casos.

Paradis et al.¹³⁴ relataram presença de atividade necro-inflamatória lobular em 27 de seus 28 casos com hepatite C crônica (97%), sendo 12 com atividade leve, 14 com atividade moderada, tendo aqueles autores também encontrado atividade lobular acentuada em apenas um caso.

Wakamatsu¹²³, também observou a presença de atividade necro-inflamatória lobular em 92% (46 casos) dos 50 casos, representado por 22 casos com atividade leve, 19 com atividade moderada e 5 com atividade acentuada. O mesmo, foi observado por Alves¹²⁴ com presença de 92% de atividade necro-inflamatória lobular, notando o predomínio de lesões leves/grau

1 com 22 casos, seguido de 19 casos com grau 2 e 5 casos apresentando lesão om grau 3.

5.4. DOENÇA GORDUROSA DO FÍGADO – ASSOCIAÇÃO COM HEPATITE C E POSSÍVEL COMORBIDADE

A presença de esteatose e demais achados da doença gordurosa num fígado com hepatite C pode ser resultante de lesão associada ao próprio VHC, a ingesta alcoólica, outras drogas ou a doença gordurosa relacionada a distúrbios metabólicos (MAFLD). Com o aumento no nível de sedentarismo, baixo nível de atividade física, consumo excessivo de calorias em relação ao gasto, ligado a desequilíbrios nutricionais não saudáveis, a doença gordurosa tem tido alta prevalência, agora inclusive reconhecida em associação com outras doenças hepáticas crônicas, inclusive por alcoolismo, provocando atualmente marcantes debates para revisão nos critérios diagnósticos de MAFLD, como podemos observar no trabalho de Eslam et al.¹³⁵ Segundo o estudo de Matteoni et al.¹³⁶ em doença gordurosa não alcoólica, o acúmulo de gordura e o desenvolvimento de stress oxidativo resultam na produção de peroxidação lipídica que estão provavelmente envolvidos no início da necroinflamação onde ocorre o estímulo da produção de neovasos, colágeno, podendo evoluir para maiores distúrbios vasculares, progressão da fibrose e posteriormente cirrose. A evolução de esteatose para cirrose em MAFLD está estimada em 4% dos casos no seguimento de 8 anos e a esteato-hepatite chega de 15 a 25% ao longo de 10 anos de evolução.¹³⁵

Kukla et al.¹²¹, afirmaram que a esteatose está presente frequentemente na evolução da hepatite C provocando lesões celulares e está relacionada intimamente com a angiogênese. Deste modo, analisamos e caracterizamos aqui os marcadores histológicos da doença gordurosa do fígado no intento de melhor compreender essas comorbidades.

O presente estudo apresentou 25 casos (35%) sem esteatose ou estimada em até 5% de hepatócitos (grau 0), 27 casos (38%) com até 30% de hepatócitos com esteatose (grau 1). De outra parte, 14 casos (19%)

apresentaram 40-60% de hepatócitos com esteatose e 6 casos (8%) com mais que 70% de hepatócitos com esteatose.

Ainda em relação a doença gordurosa, 75 % da casuística não preenchem critérios para sua classificação diagnóstica como esteato-hepatite. Deste modo, a não foi possível a caracterização dos perfis imuno-histoquímicos referentes aos vasos sanguíneos e linfáticos nos poucos casos diagnosticados como esteato-hepatites.

5.5. GENÓTIPOS

A distribuição de casos infectados pelos diversos genótipos de VHC varia muito nos diversos continentes, sendo relatada a possível associação entre a infecção por alguns desses genótipos e os padrões de lesão histológica, especialmente os ligados a metabolismo gorduroso, com esteatose ou esteato-hepatite.

Segundo Messina et al.¹³⁷, estima-se que globalmente, o genótipo 1 seja o responsável pela maioria das infecções pelo VHC com 83,4 milhões de casos (46,2%), um terço dos quais localizados na Ásia Oriental. O segundo genótipo mais comum é o 3 representando 53,3 milhões (30,1%) de casos com 3/4 dos casos localizados no sul da Ásia. Os demais casos são infectados por VHC genótipos 2,4 e 6 com 16,5 milhões (9,1%), 15 milhões (8,3%) e 9,8 milhões (5,4%) de casos respectivamente. O genótipo 5 representa 1,4 milhões (<1%) dos casos, com grande maioria na África Subsaariana Austral e Oriental. A Ásia Oriental é responsável pelo maior número de casos do genótipo 2 e do genótipo 6 do HCV, enquanto o Norte de África e o Médio Oriente têm o maior número de casos de genótipo 4.

A revisão sistemática feita por Mohd Hanafiah et al.¹³⁸ aponta que no sul da América Latina, a soroprevalência total em milhares (1.088) é predominantemente de genótipo 1 (87%), seguido do genótipo 3 (6,5%), genótipo 2 (5,7%), genótipo 4 (0,5%), genótipo 5 (0,4%) e ausência de genótipo 6.

Na Bélgica, Bouacida et al.¹³⁹, relataram prevalência do genótipo 1 (53,6%) seguido do 3 (22%), enquanto as infecções pelos 4, 2, e 5 foram

responsáveis respectivamente por 16,1%, 6,2%, e 1,9% dos casos e os genótipos 6 e 7 foram <1% dos 11.033 pacientes analisados.

Zani et al.¹⁴⁰ analisaram no estudo feito no norte da Itália que, dos 1.438 pacientes, 47,1% eram genótipo tipo 1, seguido de 40,7% de genótipo tipo 2 e 10,7% de genótipo tipo 3a.

Na França, Di Martino et al.¹⁴¹, observaram a prevalência do genótipo tipo 1 (57%), seguido pelo genótipo 3 (23%) e genótipo 2 (13%) entre os 618 pacientes

Brant et al.¹⁴² identificaram na Inglaterra que dos 18.031 casos que passaram pelos laboratórios sentinelas entre 2002 e 2007, 8.111 (45%) dos casos era genótipo 1, 7.908 (43%) dos casos era genótipo 3, 1.324 (7,3%) dos casos era genótipo 2 e 692 (3,9%) dos casos eram genótipo 4,5,6 ou combinados.

Dentre os dados disponíveis sobre a prevalência de infecções pelos diversos genótipos de VHC no Brasil, destacamos o estudo de Campiotto et al.⁸⁷ Estudando 1.688 amostras sequenciais oriundas de todas as regiões brasileiras, aqueles autores encontraram 64,9% (1.095) positivos para genótipo 1 e 30,2% (510) positivos para o genótipo 3, responsáveis, portanto, pela vasta maioria dos casos de Hepatite C em nosso país. Vale ressaltar o encontro de genótipo 2 em 4,6% (78), apenas 0,2% (3 casos) positivos para genótipo 4 e 0,1% (2 casos) infectados pelo genótipo 5 do VHC.

Assim, para atender ao objetivo de analisarmos possíveis padrões histológicos de lesão associados aos genótipos de VHC, especialmente a presença de esteatose ou de esteato-hepatite, a casuística do presente estudo incluiu os 2 genótipos mais prevalentes no Brasil: tipo 1 representando 69% e tipo 3 representando 31% dos casos. Em nosso estudo, apesar de não termos identificado associação entre os genótipos e os critérios histológicos relacionados ao estadiamento ou à graduação da atividade necro-inflamatória da hepatite C, observamos que o grupo de pacientes infectados por VHC genótipo 3 apresentou quantidade de casos com esteatose moderada/acentuada (grau 2 ou grau 3) significativamente maior que a encontrada no grupo de casos infectados por VHC genótipo 1. Cumpre destacar que não observamos aqui associação estatística entre os genótipos e o diagnóstico de esteato-hepatite.

A importante associação de esteatose com infecção por VHC genótipo 3 já havia sido relatada por Rubbia-Brandt et al.¹⁴³, que encontraram maior presença de esteatose nos 178 pacientes com genótipo 3, do que nos demais pacientes, infectados com VHC genótipos 1,2 ou 4. Em outro estudo, Rubbia-Brandt et al.¹⁴⁴ encontraram correlação significativa entre o grau de esteatose e a quantidade de RNA intra-hepático do vírus da hepatite C em pacientes infectados com o genótipo 3, cuja expressão morfológica gera um efeito citopático viral, o que não foi observado nos casos infectados com o genótipo 1.

Resumidamente, o nosso estudo histopatológico, confirmou a frequência dos critérios histológicos atribuídos ao vírus da hepatite C e evidenciou a importância de entender separadamente os fenômenos que ocorrem em cada compartimento do lóbulo hepático. Demonstramos o aumento das lesões necro-inflamatórias ao longo do curso da doença até a evolução para cirrose, e, a seguir, compararemos progressão das lesões histopatológicas com o processo de vascularização sanguínea e linfática.

5.6. ANGIOGÊNESE SANGUÍNEA

Diversos grupos tentaram demonstrar a associação relevante da angiogênese patológica com a progressão das doenças hepáticas virais, porém poucos fizeram associação com outras variáveis histológicas.^{26,145,146}

No nosso estudo objetivamos analisar individualmente a formação de novas estruturas vasculares em cada compartimento do lóbulo hepático, analisando sua possível relação com as principais alterações histológicas que ocorrem nas hepatites C crônicas.

Diversos estudos, principalmente os realizados ao longo da última década e a excelente revisão de Zadorozhna et al.¹⁴⁷ demonstram a inter-relação de fatores relacionados com a inflamação, a neoformação de vasos sanguíneos e a ativação de miofibroblastos em espaços-porta ou, principalmente, em meio ao parênquima lobular, as chamadas “células estreladas hepáticas” (HSC), também conhecidas como células de Ito. Conforme ocorre a progressão da doença, as alterações arquiteturais do tecido

comprometem de forma crucial as funções metabólicas que, nas fases mais adiantadas, podem se manifestar como insuficiência hepática e/ou hipertensão portal. A capilarização sinusoidal pode resultar na formação de barreiras ao fornecimento de oxigênio, levando então à hipóxia. Por sua vez, a hipóxia tecidual atua como um impulso para a síntese de fatores angiogênicos através da via dependente dos fatores de transcrição induzíveis por hipóxia alfa (HIF-1 α) como a produção de VEGF, angiopoietina (Ang) e os seus receptores em células estreladas hepáticas, que estimulam a ativação e migração de HSCs. As HSCs ativadas induzem uma resposta inflamatória e aumentam a angiogênese. Os novos vasos podem significativamente contribuir para a perpetuação da resposta inflamatória expressando quimiocinas e moléculas de adesão e promovendo o recrutamento de células inflamatórias. A deposição de colágeno no espaço de Disse acentua o estreitamento e distorção da luz sinusoidal aumentando a resistência do fluxo microvascular.

A substituição do parênquima normal por septos fibrosos interlobulares progressivamente dificulta o fluxo sanguíneo portal. A hipóxia consequente faz com que maior quantidade de hepatócitos seja perdida, havendo aí progressiva fibrose, com espessamento dos septos e aumentando ainda mais a resistência vascular intra-hepática. Assim, a hipóxia, fibrose hepática e a angiogênese agem concomitantemente e podem estar co-dependentemente ligados através da inflamação crônica.^{147,148}

A angiogênese sanguínea pode ocorrer através da via clássica, com o brotamento a partir de uma base de vasos pré-existentes sendo dependente da proliferação de células endoteliais com subsequente formação de lúmen no broto ou pode ocorrer através da intussuscepção consistindo na remodelação microvascular pela formação do pilar transcapilar e dependendo menos da proliferação de células endoteliais.¹⁴⁹

Com finalidade de compreender melhor a patogênese da cirrose hepática, Hano e Takasaki¹⁵⁰ montaram em três dimensões, a angioarquitetura do lóbulo hepático na hepatite C crônica através da adaptação de cortes histológicos seriados. O caso apresentado mostrou uma hepatite crônica ativa com pontes fibrosas de espaço porta para espaço porta ou veia hepática. A maioria das mudanças patológicas ocorreu na porção parenquimatosa. Em

geral, os ramos da veia porta tiveram danos como estenose, diminuição ou aumento em número e arranjos de distorções espaciais ou desaparecimento em relação aos ramos normais. Em locais acentuadamente lesionados com pontes fibrosas, a angioarquitetura lobular foi completamente perdida, enquanto as veias porta, artérias e veias hepáticas mostraram-se emaranhadas. A distorção da veia portal acompanhou-se, então, por vários graus de perda da arquitetura lobular original. Ainda que baseado na análise de apenas um caso, o grau de detalhamento deste estudo confirmou que diversos padrões de lesões vasculares ocorrem desde fases bem anteriores à transformação nodular que configura a cirrose, quando poderão surgir as manifestações clínicas como insuficiência hepatocelular e hipertensão portal. A falta de pesquisas analisando mais detidamente lesões individualizadas de vasos portais e intralobulares e sua relação com os marcadores histopatológicos de atividade necro-inflamatório e de estadiamento das lesões arquiteturais nas diversas fases evolutivas da hepatite C crônica motivou estudos como os de Guido et al.²⁶, que, de certa forma, nos inspiraram no planejamento do presente estudo, baseado na quantificação específica de brotos ou de vasos morfologicamente maduros, individualizando-os conforme sua localização portal, na região da interface ou em meio ao parênquima.

5.6.1. Angiogênese sanguínea portal

Nosso estudo demonstrou que, desde as fases iniciais, houve evidências de ativação da angiogênese sanguínea portal com tendência a crescimento do número de casos com maior formação de brotos de F0 a F3 e formação de vasos mais maduros, com luz evidente, aumentando progressivamente até a fase cirrótica (F4).

Guido et al.²⁶ avaliaram a capilarização sinusoidal e a densidade de microvasos portais em 74 pacientes, 22 dos quais apresentando hepatite crônica B e 52 apresentando hepatite crônica C, relatando não haver diferença significativa entre o perfil vascular dos pacientes com hepatite B crônica e hepatite C crônica. Demonstraram que a neoformação de vasos portais de parede delicada, que denominaram “angiomatose portal” e sua

semiquantificação mostraram-se significativamente associadas com o estágio de alteração estrutural. Assim, Guido et al.²⁶ concluíram que as alterações na microvasculatura intra-hepática estão relacionadas à fibrogênese e podem afetar a progressão da doença. Observaram também que tal aumento da densidade microvascular portal já ocorre mesmo nos estádios de fibrose precoce e/ou intermediárias, aspectos destacados de modo muito similar em nosso presente estudo.

A hipótese para tal incremento na angiogênese hepática é que o processo inflamatório crônico, promova a ativação de fatores de crescimento vascular. Salcedo et al.¹⁵¹ detectaram aumento nos níveis séricos de VEGF em relação ao grupo controle e Giatromanolaki et al.¹⁵² que demonstraram super expressão de VEGF no fígado cirrótico comparado ao fígado normal e possuem papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática através da estimulação progressiva de fibroblastos. Hassan et al.¹⁵³ demonstraram a existência da expressão das proteínas TGF- β 2, VEGF, e CD34 nas 32 biópsias hepáticas de pacientes crônicos infectados com VHC ao contrário do grupo controle (6 casos), grupo com hepatite B crônica (10 casos) e grupo com hepatite autoimune (10 casos) que não apresentaram expressão. Dentre os 32 casos com VHC, 6 casos (18%) tiveram fraca expressão de TGF, VEGF e CD34, 11 casos (34%) tiveram expressão detectável mas não forte e 15 casos (47%) tiveram forte expressão. A interferência da proteína core do VHC nos caminhos de sinalização intracelular nas células hepáticas resulta na produção de TGF- β 2 que desencadeia a produção de VEGF.

Yoshiji et al.¹⁵⁴ observaram aumento progressivo do grau de expressão de VEGF ao longo da fibrogênese hepática e até as fases finais, inclusive na carcinogênese, com índices máximos de VEGF no carcinoma hepatocelular.

Nossos achados no presente estudo demonstram a íntima associação da quantificação dos brotos sanguíneos portais com os vasos sanguíneos portais completos, notando-se apenas 4 casos com alto grau de vasos completos e poucos brotos vasculares sanguíneos. Devemos mencionar que a visualização histológica dos vasos completos é bem mais evidente, sendo significativa sua relação direta com os estádios arquiteturais.

Como podemos observar também no estudo de Krasinskas et al.¹⁵⁵ que foi um dos primeiros a relatar as anomalias vasculares, semelhantes às observadas na hipertensão portal não-cirrótica, em biópsias de fígado transplantados e em fígados nativos com doenças crônicas de várias causas, o número de espaços porta com veia porta anormal e vasos fragmentados correlacionou-se positivamente com o aumento da fibrose na hepatite C crônica.

Observamos no nosso estudo que a quantidade de casos com muitos vasos sanguíneos portais aumentou à medida que progrediram as alterações estruturais. Nos estádios F0-F1-F2 obtivemos 13 casos com muitos vasos, o que aumentou para 22 casos nos estágios F3-F4. O aumento foi significativo na análise agrupada e em cada grau de aumento do dano estrutural (F0=0, F1=5, F2=8, F3=10 e F4=12), sugerindo ativação precoce e mantida na angiogênese portal.

O mesmo observamos no trabalho de Amarapurkar et al.¹⁴⁵ que ao comparar o estágio de fibrose, tanto a expressão de CD34 bem como a de VEGF foram significativamente maiores nos estádios 3 e 4 em comparação com os estádios 1 e 2 de fibrose. De modo similar, Kuroda et al.¹⁵⁷ verificaram a arquitetura vascular hepática de pacientes com hepatite C através de exame de imagem microvascular na evolução da fibrose hepática em 100 pacientes. Verificaram que a expressão do endotélio, estava restrita a pequenos vasos nos espaços porta. Nos estádios F0-F1, a coloração foi limitada ao endotélio dos vasos portais, detectando-se numerosos vasos nos estádios F3-F4.

Uma análise interessante em nosso estudo foi a abordagem individualizada da presença e semi-quantificação de vasos de parede muscular portal, possivelmente pioneira no contexto de amostras de biópsia em hepatites C crônicas. Tal tipo de vaso aparentemente teve, em nossa casuística, formação mais tardia na progressão dos danos estruturais principalmente nos estádios F3-F4. Este aumento é aparentemente maior na transição para a cirrose (F4), o que contribui com as complicações da doença. Veias porta anormais em espaços porta pequenos podem ser vistas em associação com várias causas da hipertensão portal, como a hipertensão portal não-cirrótica e cirrose.

Outra possibilidade é que os vasos anômalos de parede muscularizada que detectamos de modo peculiar no presente trabalho possam

corresponder a proliferação ou a alongamento anômalo, com aumento de sinuosidade e talvez enovelamento de ramos arteriais, hipoteticamente alterados diante da progressiva resistência oferecida pela rede ajusante de microvasos no parênquima, especialmente em estádios mais avançados da doença, F3 e F4. Esperamos que tal resultado motive trabalhos futuros eventualmente com novos modelos como os de Hano¹⁵⁰ ou mesmo os recentes modelos revistos por Zadorozhna et al.¹⁰⁰ e os de Goulart et al.¹⁵⁷ e Caires-Junior et al.¹⁵⁸

A neovascularização é, há décadas, reconhecidamente associada ao processo inflamatório e o aumento no fluxo sanguíneo e vasodilatação da veia porta antes do surgimento dos primeiros brotos capilares são importantes passos.¹⁵⁹ Desta forma, já era esperado que o grau de infiltrado mononuclear portal/septal, no nosso estudo tenha se mostrado-se diretamente relacionado com o grau de formação de brotos vasculares sanguíneos, tendo sido observada também tendência deste tipo de relação quando se quantificou o número de vasos sanguíneos portais maduros. A nosso ver, esta não atingiu significância estatística devido à decisão original de agrupar os casos com inflamação portal 0, 1 e 2 x 3 e 4, enquanto a diferença mais evidentemente observada foi com inflamação 1 x 2.

Como já discutido na histopatologia, a atividade inflamatória de interface (periportal/perisseptal) é considerada um dos principais indicadores histológicos de atividade e potencial de progressão em hepatites crônicas.

Segundo Kane III et al.¹⁶⁰, Ziche et al.¹⁵⁹, Mihm et al.¹⁶¹, Moruhara et al.¹⁶², a hepatite C sendo uma doença inflamatória crônica, induz o óxido nítrico sintase induzível (iNOS) resultando no aumento da produção de óxido nítrico (NO) que é regulador dos eventos microvasculares necessários para a neovascularização e medeia a angiogênese.

Salcedo et al.¹⁵¹ também demonstraram uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis séricos de VEGF e grau de inflamação, sugerindo assim que os mediadores inflamatórios estão envolvidos no estímulo da angiogênese através da super expressão do VEGF.

Hassan et al.¹⁶³ demonstraram uma associação entre os níveis de NO e o desenvolvimento e progressão da cirrose hepática e a reação

inflamatória no fígado cirrótico, resultando em mais produção de óxido nítrico sintase induzível 2 (iNOS-2) e conseqüentemente de óxido nítrico.

No presente estudo, a graduação da atividade inflamatória periportal mostrou tendência a relação diretamente proporcional à maior formação de brotos sanguíneos portais. A nosso ver, a diferença foi mais evidente na transição entre os graus de atividade periportal 1 x 2 (1 caso x 11 casos com muitos brotos). Representado por 49% da casuística, a relação entre a atividade de interface com a formação de vasos sanguíneos portais completos mostrou-se significativa, com incrementos progressivos evidentes em cada grau e mais acentuado entre os graus de atividade inflamatória periportal 1 (2 casos) e 2 (11 casos) e também de 2 para 3 (19 casos). O mesmo padrão de crescimento foi evidenciado quanto aos vasos sanguíneos de parede muscularizada portal, sendo tal aumento mais marcante na transição entre graus 2 (4 casos) e 3 (11 casos) de atividade inflamatória de interface.

A graduação da atividade inflamatória no parênquima mostrou relação direta significativa com a angiogênese sanguínea portal, tanto marcada pela formação de brotos (43% de casos com muitos brotos) como de vasos completos (49% de casos com muitos vasos) em especial, a transição da atividade periportal grau 1 (10 casos) para 2 (16 casos), muito valorizada na histopatologia. O mesmo padrão de crescimento foi evidenciado quanto aos vasos sanguíneos de parede muscularizada portal, sendo tal aumento mais marcante na transição entre graus 1 (3 casos) e 2 (11 casos) de atividade inflamatória no parênquima.

A capilarização nas áreas lobulares e periportais se correlacionou diretamente com o grau de fibrose, o que também observamos em nosso estudo.

Os marcadores histológicos de doença gordurosa, esteatose ou o próprio diagnóstico de esteato-hepatite, não apresentaram, no presente estudo, relação com o grau de formação de brotos sanguíneos, vasos sanguíneos e vasos sanguíneos muscularizados portais.

Dentre os trabalhos publicados a que tivemos acesso, não encontramos relatos de associação entre o genótipo do VHC e os padrões de

brotos, vasos sanguíneos portais e vasos sanguíneos portais muscularizados. Nossos resultados também não comprovaram tal associação.

5.7. ANGIOGÊNESE SANGUÍNEA NA INTERFACE E NO PARÊNQUIMA

Poucos estudos fizeram análise individualizada do padrão de vascularização em cada compartimento do lóbulo hepático.

No presente estudo, a formação de brotos vasculares sanguíneos na interface mostrou incremento de tais brotos nas fases iniciais de dano estrutural (F0-F1-F2=20 casos e F3-F4=8 casos com muitos brotos) e depois caindo até a fase cirrótica, sugerindo que tal formação de brotos logo dá origem a vasos sanguíneos.

Comportamento similar foi observado com a formação de vasos sanguíneos completos onde 27 casos tiveram muitos vasos (35%) separados em F0-F1-F2=19 casos e F3-F4=6 casos com muitos vasos. Uma interpretação para tal achado é que, com o progredir dos danos arquiteturais, os vasos formados na interface vão sendo circundados pelos fibroblastos que aí depositam a matriz extracelular incluindo os vasos neoformados no interior dos septos. O estudo feito por Ohmori et al.¹⁴⁶ também baseado em amostras hepáticas obtidas mediante biópsia por agulha mostrou que as células endoteliais positivas para CD34 tendem, nas fases iniciais de doença, a se distribuir nos sinusóides próximos a área portal. Com a progressão da hepatopatia crônica, as células endoteliais positivas tornam-se mais intensas e se espalham para o centro dos lóbulos do fígado. Em sua avaliação quantitativa, aqueles autores descobriram aumento de células endoteliais CD34 positivas por lóbulo conforme a progressão da doença hepática crônica associada ao VHC, sendo mais elevada na cirrose do que na hepatite crônica.

Da mesma forma, o estudo de Guido et al.²⁶ mostrou padrão de capilarização em 23 (57,5%) dos 74 casos, sendo 13 casos com capilarização periportal e 10 casos com capilarização difusa (capilarização se estendem até ao parênquima lobular).

No nosso estudo, a quantificação dos brotos sanguíneos na interface mostrou-se diretamente relacionada à dos vasos completos. Saliente-se o encontro de 3 casos com alto grau de brotos vasculares sanguíneos, mas com apenas pouco vasos completos na interface. Devemos salientar que, na interface, não detectamos vasos sanguíneos muscularizados.

No presente estudo, não foi detectada relação entre o grau de infiltrado mononuclear portal/septal com a formação de brotos vasculares ou com vasos sanguíneos completos na interface. O mesmo ocorreu com a atividade necro-inflamatória periportal/perisseptal e com a inflamação no parênquima. Nossa interpretação é que a incorporação dos brotos e dos vasos completos ao interior dos septos em meio à fibrogênese impede sua adequada análise em separado dos vasos originalmente formados nos próprios espaços-porta.

Os marcadores histológicos de doença gordurosa, esteatose ou o próprio diagnóstico de esteato-hepatite, não apresentaram relação com o grau de formação de brotos ou vasos sanguíneos na interface.

A tipagem molecular do VHC em genótipos 1 e 3 não apresentou relação com o grau de formação de brotos sanguíneos em interface. De outra parte, maior quantidade de amostras de casos de infecção pelo genótipo 3 do VHC apresentaram alto grau de formação de vasos sanguíneos completos em interface do que o observado no conjunto de casos infectados pelo genótipo 1.

Kuroda et al.¹⁵⁶ notaram que além dos espaços porta, havia marcações nos sinusóides do parênquima hepático perto de áreas portais, como pontos, lineares, semicirculares, e padrões de coloração circulares.

Ao contrário de Tsuji et al.¹⁶⁴ que não observaram imunorreatividade nas células do parênquima.

Kaur et al.¹⁶⁵ verificaram que o número de células endoteliais progenitoras circulantes foi substancialmente maior em pacientes cirróticos em comparação com controles e foi correlacionado com a progressão da doença hepática crônica. De modo similar, o trabalho de Rautou¹⁶⁶ encontrou número de células progenitoras maior em pacientes cirróticos, levantando a hipótese de que as células progenitoras endoteliais contribuem na angiogênese.

O estudo de Iwakiri e Kim¹⁶⁷ explica que na hepatite C, a diminuição do NO derivado de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células

endoteliais sinusoidais hepáticas causa disfunção microvascular hepática e facilita o desenvolvimento de fibrose/cirrose e hipertensão portal.

Em nosso presente estudo, a quantificação dos brotos sanguíneos no parênquima mostrou-se diretamente relacionada à dos vasos completos, resultando na progressiva capilarização dos sinusóides, que já se mostrou presente em fases anteriores à caracterização de cirrose. Essas variáveis não apresentaram associação significativa com os indicadores histológicos de atividade da hepatite crônica.

5.8. ALTERAÇÕES DE VASOS LINFÁTICOS

Diante da escassez de trabalhos mostrando as variações morfológicas do sistema linfático em amostras de biópsia hepática ao longo da evolução de hepatites crônicas, principalmente em fases anteriores à cirrose, delineamos uma abordagem semi-quantitativa comparando os diversos padrões de vasos linfáticos melhor visualizados mediante imunomarcção da podoplanina pelo uso do anticorpo monoclonal D2-40 escolhendo, para tal, o modelo da hepatite C crônica em humanos, representando os diversos estádios de alteração arquitetural. Esperamos que esses dados abram caminho para estudos futuros nos quais possa ser possível ulterior análise de aspectos moleculares.

De acordo com a revisão feita por Tanaka e Iwakiri²⁹, os mecanismos moleculares no fígado ainda precisam ser elucidados, e portanto devemos aplicar a teoria do processo de linfangiogênese a partir dos estudos em outros órgãos e em modelos animais, como estudado por Hoffman et al.¹⁶⁸

Assim como ocorre na angiogênese, a extensão e duração da linfangiogênese depende da mudança no equilíbrio entre fatores pró e anti-linfangiógênicos. Inflamação crônica e neoplasias malignas no fígado induzem vários fatores de crescimento pró-linfangiógênicos, incluindo fatores de crescimento endotelial vascular C/D (VEGF-C/D) que estimulam a linfangiogênese *in vivo*.^{29,169}

Na linfangiogênese patológica, os novos vasos linfáticos crescem principalmente através da germinação de células existentes e de

células hematopoiéticas derivadas da circulação endotelial e macrófagos diferenciados, que são supostamente fontes de células endoteliais linfáticas.^{169,170}

Entre as várias células da resposta imune, os macrófagos são os que mais interagem com os vasos linfáticos. As células endoteliais linfáticas secretam fatores quimiotáticos para atrair macrófagos que assim como as células dendríticas, secretam citocinas como VEGF-C e VEGF-D.^{29,171}

Nas condições de inflamação crônica como hepatite crônica ou cirrose, os macrófagos ativados secretam VEGF-C e/ou VEGF-D. VEGF-C/VEGF-D liga-se ao receptor VEGFR-3 na membrana plasmática das células endoteliais linfáticas. Essa ligação é essencial para a germinação inicial e orientação na migração, bem como para a subsequente sobrevivência das células endoteliais linfáticas.^{29,30,169,170,71,172,}

A ligação VEGF-C/D e VEGFR-3 traduz sinais através das várias vias de sinalização, cuja ativação facilita a proliferação e a migração das células endoteliais linfáticas promovendo a linfangiogênese. Essa via é o caminho mais conhecido para a formação de novos vasos, demonstrando que a inflamação e a disfunção do sistema imune estão intimamente associadas ao aumento da linfangiogênese.^{29,30,169,170,71,172,}

Nas doenças crônicas hepáticas, segundo Vollmar et al.¹⁷³, em ratos, o aumento do fluxo linfático é um mecanismo importante através do qual o fluido pode contornar o aumento da resistência sinusoidal/pós-sinusoidal.

Tanaka e Iwakiri³⁰ afirmam que a produção de linfa é proporcional a pressão hidrostática no interior da microcirculação sinusoidal do fígado. Segundo aqueles autores, em fígados cirróticos humanos, a pressão hidrostática sinusoidal aumenta devido ao aumento na resistência ao sangue sinusoidal e conseqüentemente, aumentam os componentes do plasma filtrados formando a linfa.

Os estudos de Witte et al.¹⁷⁴ comprovaram o aumento da resistência do fluxo sanguíneo sinusoidal devido as alterações arquiteturais em fígados humanos com fibrose e cirrose. Barrowman e Granger¹⁷⁵ comprovaram o mesmo aumento da resistência em fígados cirróticos de ratos com cirrose induzida por fenobarbitona de sódio e tetracloreto de carbono. Em fígados

cirróticos, o fluído linfático produzido aumenta até 30 vezes, o número de vasos linfáticos aumenta e os vasos linfáticos da superfície hepática dilatam. Em outra interessante abordagem, Aspestrand et al.¹⁷⁶ documentaram o encontro de vasos linfáticos dilatados através de tomografia computadorizada em pacientes cirróticos.

O aumento de vasodilatadores, em especial o óxido nítrico, e deficiência nas vias de sinalização para atividade de contração em células musculares lisas em resposta a estimulação vasoconstritora contribui para a diminuição na responsividade vascular.¹⁷⁷

A deficiência na drenagem linfática foi relatada por Ribera et al.¹⁷⁸ em ratos cirróticos com ascite, acompanhada por um aumento dos níveis de eNOS e da produção de NO pelas células endoteliais isoladas de vasos linfáticos mesentéricos de ratos cirróticos. Também houve diminuição da camada de células musculares lisas em vasos linfáticos naqueles ratos, a qual foi revertida por tratamento com um inibidor de NOS. Aqueles autores sugerem que a regulação de NO nas células endoteliais linfáticas de ratos cirróticos provocam uma remodelação linfática a longo prazo, que se caracteriza por uma perda da camada de células musculares lisas.

Bohlen et al.¹⁷⁹, afirmam que a formação de óxido nítrico pelo bulbo linfático e válvulas é um componente regulador importante no bombeamento linfático. Os linfáticos produzem óxido nítrico (NO) durante a sua contração com corte de fluxo nas células endoteliais. O aumento na liberação de NO devido ao aumento de fluxo linfático provoca diminuição da tonicidade diastólica, aumento de diâmetro, diminuição do volume sistólico e da frequência de contração. Portanto, o óxido nítrico produzido nas células endoteliais linfáticas contribui para a regulação dos fluxos linfáticos, modulando a contratilidade das células musculares lisas. Semelhantemente ao que ocorre na angiogênese, observa-se que o óxido nítrico também afeta a linfangiogênese.

Um aumento na vasodilatação combinado com a resistência vascular intra-hepática por fibrose resulta na hipertensão portal.¹⁷⁷ Em doentes com cirrose avançada e hipertensão portal, a regulação do volume de fluido extracelular é frequentemente anormal e a deficiência no sistema linfático resulta na acumulação de fluidos como a ascite, efusão pleural ou edema. A ascite

relacionada à cirrose é a manifestação clínica das doenças vasculares linfáticas mais comum em decorrência da hipertensão portal.^{180,181}

Oikawa et al.⁴³ relataram que a área dos vasos linfáticos portais aumenta na hipertensão portal idiopática (IPH) e especularam que a formação de novos vasos linfáticos na cirrose ocorre como modo de adaptação ao aumento do fluxo linfático. Esta resposta linfangiogênica compensatória pode ajudar a reduzir a pressão portal elevada observada tanto na hipertensão portal idiopática como hipertensão portal que se desenvolve na cirrose hepática.

O fornecimento nutricional através do suprimento sanguíneo abundante e adjacente mantém o equilíbrio dos fluídos para que haja a contratibilidade adequada e capacidade de regeneração rápida das finas paredes linfáticas.^{38,182}

Em nosso estudo, até onde sabemos, um dos pioneiros na contagem de brotos e de vasos linfáticos em cada compartimento de lóbulos em hepatites crônicas em humanos, verificamos que a quantidade de casos com muitos brotos linfáticos portais mostrou aumento à medida que progrediram as alterações estruturais, sugerindo ativação precoce e mantida da linfangiogênese portal.

Igualmente verificamos crescimento progressivo no número de vasos linfáticos maduros em espaços porta, com valor máximo nos fígados cirróticos.

A distribuição entre os padrões de brotos e de vasos linfáticos nos espaços porta foi praticamente idêntica, mostrando a relação direta entre os dois tipos de achado e reforçando o conceito de que a sequência morfológica que reflete a linfangiogênese nos espaços porta e septos fibrosos inicia-se com a ativação de células endoteliais linfáticas positivas para podoplanina, dando origem aos brotos linfáticos, que dão origem aos vasos linfáticos maduros nos espaços porta, sendo esta íntima relação mantida desde fases iniciais da hepatite crônica até as fases avançadas de cirroses associadas ao VHC.

Os nossos resultados de análise de linfangiogênese hepática em amostras humanas colhidas mediante biópsia por agulha mostram vários aspectos similares aos relatados em experimentos animais por Vollmar et al.¹⁷³ e Tugues et al.¹⁸³, e ao estudo de Yamauchi et al.¹⁸⁴ em amostras de biópsia de

fígado humano em Hepatites crônicas B e C e Yokomori et al.⁴⁷ em amostras cirúrgicas de fígado humano com cirrose por VHC.

Utilizando microscópio de fluorescência de alta resolução, Vollmar et al.¹⁷³ avaliaram simultaneamente a troca macromolecular hepática a partir da microvasculatura sinusoidal e do sistema linfático hepático em ratos nas fases iniciais após a exposição à a droga hepatotóxica CCl₄. Aqueles ratos caracterizavam-se por um retardo progressivo na troca de macromoléculas hepáticas no sangue implicando no aparecimento de barreiras de difusão dentro do fígado fibrótico e cirrótico. Em paralelo, naqueles animais, foi observado aumento acentuado tanto da densidade dos vasos linfáticos como da área dos vasos linfáticos. A análise de regressão linear revelou uma correlação significativa na medida em que quanto mais retardada a capacidade de troca macromolecular sinusoidal, maior a densidade da rede linfática. Desta forma, a rede linfática aumentou de acordo com as alterações fibróticas em ratos.

Os mesmos achados foram demonstrados por Tugues et al.¹⁸³ que objetivaram avaliar as diferenças nos padrões de expressão gênica entre as células endoteliais hepáticas (LECs) de ratos controle e cirróticos (induzidos por inalação de CCl₄) utilizando microarrays. O resultado daquele estudo revelou numerosos vasos linfáticos em fígados cirróticos, especificamente em septos e tecido lesionado se comparados com os fígados de controle.

Não havia relatos que os dados encontrados por Vollmar et al.¹⁷³ eram aplicáveis ao fígado humano nas várias fases da hepatite crônica. Por isso, Yamauchi et al.¹⁸⁴ estudaram, por métodos morfométricos, as alterações que ocorrem nos vasos linfáticos hepáticos humanos durante o curso da hepatite viral crônica e a sua progressão para cirrose utilizando 62 amostras hepáticas obtidas de pacientes com hepatite crônica B e C e cirrose. Aqueles autores investigaram a relação entre fibrose hepática, inflamação hepática, e alterações nos vasos linfáticos. A relação entre os vasos linfáticos e a atividade da hepatite também foi estudada. Eles realizaram a mesma metodologia em vasos sanguíneos e fizeram a comparação entre vasos sanguíneos e linfáticos. Não encontraram diferenças significativas nos dados para os vasos linfáticos ou sangue entre a hepatite causada pelo vírus da hepatite B e o vírus da hepatite C.

Além do número de vasos, Yamauchi et al.¹⁸⁴ estudaram a área ocupada pela luz de cada vaso linfático, constatando que tal área era significativamente maior na cirrose do que em vasos com outros graus de fibrose (leve, moderada e grave). Vale ressaltar que, naquele estudo, não foram encontradas diferenças tanto em relação a área de cada vaso ou número de vasos entre os grupos com fibrose leve, moderada e grave. Contudo, o número de vasos linfáticos em cada corte tendeu a aumentar em associação com a progressão do estadiamento. Os dados apresentados por aqueles autores indicam que o número de vasos linfáticos dentro do espaço porta mostra uma forte correlação com o grau de expansão do espaço porta.

As análises histoquímicas e morfométricas de Yamauchi et al.¹⁸⁴ produziram resultados de acordo com os resultados do estudo de Vollmar et al.¹⁷³, mostrando que os vasos linfáticos no fígado aumentam em tamanho e número com a progressão da fibrose em hepatites crônicas.

Assim, os poucos dados disponíveis em hepatopatias crônicas em humanos, os vasos linfáticos aumentam e expandem-se de acordo com a progressão da doença, com as alterações progressivas da arquitetura lobular e a correspondente fibrose, aspecto similar ao que observamos no presente estudo ao compararmos o número de vasos com o estadiamento das alterações arquiteturais, Yokomori et al.⁴⁷ realizaram estudo em 16 amostras cirúrgicas de fígado normal e cirrótico com carcinoma hepatocelular e hepatite C e observaram maior imunoreatividade positiva do CD34 em vasos centrais e portais, bem como vênulas portais terminais e uma leve imunoreatividade nos vasos linfáticos do trato portal, alguns dos quais eram paralelas às artérias hepáticas. Aqueles autores correlacionaram positivamente a linfangiogênese com a gravidade da doença. Os resultados daquele estudo demonstraram que o número e o tamanho dos vasos linfáticos aumentam conforme a progressão das alterações arquiteturais e fibrose e em especial nas fases avançadas de cirrose que necessita de transplante. Os autores destacam nuances no tamanho e número dos vasos linfáticos que diferem consideravelmente do que se vê nos vasos sanguíneos.

Em nosso estudo, além do estudo do comportamento dos vasos linfáticos ao longo das diversas etapas (estádios) das alterações estruturais,

comparamos também com as variáveis histológicas indicativas de atividade inflamatória em cada compartimento e encontramos associação da quantidade de brotos e vasos linfáticos portais com a inflamação portal e a atividade necroinflamatória parenquimatosa.

Assim, no quesito “atividade inflamatória”, nosso resultado diferiu daquele obtido por Yamauchi et al.¹⁸⁴ que concluíram que o número e as áreas de linfáticos não diferiram significativamente com a atividade da hepatite. De outra parte, os achados do presente estudo e os de Yamauchi et al.¹⁸⁴ foram similares quanto à associação de maior formação de vasos linfáticos nos casos de hepatite C em estádios arquiteturais mais avançados

A atividade periportal/perisseptal e tipo de genótipo não demonstraram associação com o número de vasos linfáticos, bem como as variáveis relacionadas a comorbidades, como esteatose e esteato-hepatite.

Em nosso atual estudo, visando a identificação imuno-histoquímica de eventuais aspectos correspondentes aos espaços de Mall, propusemos-nos a procurar estruturas marcadas para D2-40 na interface entre os espaços porta e o parênquima. Entretanto, algumas estruturas de aspecto próprio de vasos linfáticos foram encontradas apenas em 2 casos, não tendo sido encontradas estruturas próprias de brotos linfáticos. Assim, não pudemos realizar quaisquer análises referentes à possível transição entre os espaços intersticiais e os primeiros canais linfáticos nos diversos estádios da Hepatite C crônica.

Assim como já era conhecido em fígado normal, o presente estudo não identificou a presença de vasos linfáticos na região do parênquima. Do mesmo modo, em estudo de 16 amostras cirúrgicas Yokomori et al.⁴⁷ haviam relatado o encontro de escassos ou nenhum vaso linfático no parênquima, quer em fígado normal, quer em fígado cirrótico com carcinoma hepatocelular associados a VHC.

Em síntese, o presente estudo gera dados que poderão servir de base para análises futuras correlacionando os atuais achados histológicos e os padrões imuno-histoquímicos dos microvasos sanguíneos e linfáticos com análises moleculares. Em especial, fica a expectativa de correlação dos achados morfológicos com a identificação tecidual de moléculas que, em análises

experimentais, já têm se mostrado potencialmente úteis no bloqueio da angiogênese.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo retrospectivo de 72 casos de pacientes portadores do VHC submetidos a biópsia hepática por agulha com objetivo de analisar a vascularização sanguínea e linfática por imuno-histoquímica em comparação com aspectos histológicos de lesão hepática atribuíveis ao VHC e à doença gordurosa, bem como ao genótipo viral propiciou os seguintes resultados e conclusões :

O número de microvasos portais mostrou crescimento em paralelismo com a evolução das alterações arquiteturais, coerente com a relevância da neoformação de vasos sanguíneos portais no processo inflamatório, acompanhando a fibrose, com maior formação de brotos de F0 a F3 e formação de vasos mais maduros crescendo até fase cirrótica (F4), coerente com o mecanismo de formação de neovasos primeiramente sob a forma de brotos, seguindo-se a formação de vasos maduros, progressivamente mais evidentes. Tais achados sugerem ativação precoce e mantida da angiogênese portal.

A presença de vasos de parede muscular na região portal foi mais evidente nas fases avançadas de alterações estruturais, principalmente nos estádios F3-F4, maior na transição para a cirrose (F4). Aventa-se assim a hipótese de que os vasos anômalos de parede muscularizada que detectamos de modo peculiar no presente trabalho possam corresponder a proliferação ou a alongamento anômalo, com aumento de sinuosidade e talvez enovelamento de ramos arteriais ou veias que assumem parede muscularizada. Tais vasos seriam hipoteticamente alterados diante da progressiva resistência oferecida pela rede ajusante de microvasos no parênquima, especialmente em estádios mais avançados da doença, F3 e F4, podendo assim ter relação com o surgimento de complicações da doença

A formação de brotos sanguíneos portais mostrou também tendência a associação com a graduação da atividade inflamatória periportal, relação que se mostrou mais significativa com a formação de vasos sanguíneos portais completos. Também aumentaram os vasos sanguíneos de parede muscularizada portal, sendo tal aumento mais marcante na transição entre graus 2 e 3 de atividade inflamatória de interface. A angiogênese sanguínea portal, tanto marcada pela formação de brotos como de vasos completos e até de vasos

sanguíneos portais de parede muscularizada mostrou-se ainda significativamente associada ao grau de necro-inflamação no parênquima. No conjunto, esses achados demonstram que a neoformação vascular portal associa-se tanto com a progressão das alterações estruturais como com a ativação do próprio processo inflamatório. Tais achados estimulam ainda mais os modernos estudos moleculares, devendo os futuros pesquisadores analisarem os efeitos da eliminação do vírus, agora possível com terapia antiviral direta, na evolução das alterações da microvasculatura, seja como progressão ou como regressão.

A quantificação dos brotos sanguíneos na interface mostrou-se diretamente relacionada à dos vasos completos. Destacamos o incremento de brotos vasculares sanguíneos na interface nas fases iniciais de dano estrutural até F2, contrastando com sua redução a partir daí e até a fase cirrótica, sugerindo que tal formação de brotos logo dá origem a vasos sanguíneos. Esse achado merece estudos futuros, principalmente para avaliar a hipótese de que a ativação contínua de fibroblastos na interface promova deposição de matriz fibrosa que progressivamente substitua os vasos formados nas fases iniciais da doença

A quantidade dos brotos sanguíneos no parênquima mostrou-se diretamente relacionada à dos vasos completos, resultando na progressiva capilarização dos sinusóides, que já se mostrou presente bem antes da caracterização de cirrose. Essas variáveis não mostraram associação significativa com os indicadores histológicos de atividade da hepatite crônica.

Nossa abordagem semi-quantitativa aos diversos padrões de vasos linfáticos melhor visualizados mediante imunomarcagem da podoplanina pelo uso do anticorpo monoclonal D2-40 pode ser considerada dentre as pioneiras no estudo de amostras de biópsia hepática ao longo da evolução de hepatites crônicas.

Verificamos que a quantidade de casos com muitos brotos linfáticos portais e, em pleno paralelismo, os com muitos vasos linfáticos portais maduros, mostrou aumento à medida que progrediram as alterações estruturais, mostrando, em humanos, aspectos já evidenciados por outros autores, principalmente em experimentos com animais.

Em relação a atividade inflamatória, a quantidade de casos com muitos brotos e vasos linfáticos portais mostrou aumento significativo à medida que aumentou a atividade necro-inflamatória portal e parenquimatosa, mas não se mostrou associada com a atividade periportal.

Assim como já era conhecido em fígado normal, não identificamos aqui a presença de vasos linfáticos quantificáveis na região periportal ou no parênquima.

O presente estudo gera dados que poderão servir de base para análises futuras correlacionando os atuais achados histológicos e os padrões imuno-histoquímicos dos microvasos sanguíneos e linfáticos com análises moleculares, já que vários fatores de crescimento têm se mostrado envolvidos na angiogênese. Em especial, fica a expectativa de correlação com marcadores moleculares que, em alguns estudos, têm se mostrado potencialmente úteis no bloqueio da angiogênese, o que poderá se refletir em futuras intervenções com finalidades terapêuticas.

7. ANEXO

Anexo A. Contagem de brotos e vasos sanguíneos marcados pelo endotélio no espaço porta

| Contagem de brotos e vasos sanguíneos marcados pelo endotélio | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| CASO | Espaços Porta | | | | | | | | | | | |
| | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 1 | 16 | 11 | 10 | 17 | 16 | 14 | 4 | 3 | 12 | 2 | 2 | 5 |
| 2 | 8 | 7 | 6 | 9 | 18 | 10 | 1 | 8 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| 3 | 15 | 12 | 16 | 13 | 13 | 14 | 3 | 16 | 9 | 6 | 7 | 8 |
| 4 | 5 | 9 | 13 | 9 | 10 | 9 | 2 | 4 | 1 | 5 | 2 | 3 |
| 5 | 7 | 5 | 10 | 13 | 7 | 8 | 7 | 5 | 0 | 3 | 4 | 4 |
| 6 | 5 | 1 | 10 | 3 | 4 | 5 | 4 | 1 | 3 | 0 | 1 | 2 |
| 7 | 5 | 8 | 7 | 11 | 9 | 5 | 3 | 5 | 6 | 10 | 12 | 7 |
| 8 | 4 | 9 | 4 | 3 | 3 | 5 | 9 | 2 | 3 | 13 | 10 | 7 |
| 9 | 20 | 3 | 15 | 10 | 17 | 13 | 4 | 10 | 5 | 5 | 4 | 6 |
| 10 | 18 | 4 | 2 | 5 | 9 | 8 | 3 | 5 | 4 | 2 | 11 | 5 |
| 11 | 8 | 16 | 9 | 2 | 7 | 8 | 10 | 6 | 10 | 8 | 13 | 9 |
| 12 | 5 | 6 | 15 | 7 | 5 | 8 | 5 | 3 | 7 | 6 | 13 | 7 |
| 13 | 2 | 19 | 12 | 6 | 14 | 11 | 5 | 18 | 13 | 5 | 9 | 10 |
| 14 | 3 | 5 | 15 | 4 | 1 | 6 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 15 | 6 | 4 | 6 | 7 | 3 | 5 | 3 | 8 | 3 | 6 | 4 | 5 |
| 16 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 4 | 3 | 6 | 4 | 1 | 4 |
| 17 | 15 | 3 | 5 | 5 | 8 | 7 | 7 | 15 | 10 | 15 | 14 | 12 |
| 18 | 2 | 4 | 5 | 10 | 6 | 5 | 21 | 13 | 7 | 18 | 23 | 16 |
| 19 | 9 | 6 | 2 | 15 | 0 | 6 | 10 | 5 | 0 | 13 | 8 | 7 |
| 20 | 4 | 4 | 6 | 11 | 5 | 6 | 2 | 15 | 15 | 13 | 1 | 9 |
| 21 | 6 | 9 | 4 | 5 | 10 | 7 | 10 | 4 | 3 | 5 | 14 | 7 |
| 22 | 0 | 2 | 1 | 5 | 2 | 2 | 7 | 3 | 4 | 13 | 3 | 6 |
| 23 | 3 | 10 | 9 | 21 | 9 | 10 | 16 | 3 | 3 | 5 | 5 | 6 |
| 24 | 8 | 4 | 10 | 4 | 6 | 6 | 8 | 9 | 4 | 12 | 13 | 9 |
| 25 | 5 | 6 | 4 | 9 | 8 | 6 | 15 | 15 | 13 | 13 | 11 | 13 |
| 26 | 7 | 3 | 8 | 6 | 12 | 7 | 7 | 12 | 17 | 23 | 11 | 14 |
| 27 | 6 | 0 | 0 | 9 | 3 | 4 | 11 | 7 | 14 | 20 | 5 | 11 |
| 28 | 1 | 4 | 5 | 1 | 3 | 3 | 14 | 14 | 11 | 6 | 8 | 11 |
| 29 | 14 | 10 | 14 | 15 | 18 | 14 | 3 | 10 | 4 | 3 | 2 | 4 |
| 30 | 4 | 4 | 1 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 4 | 2 | 2 |
| 31 | 1 | 1 | 7 | 5 | 8 | 4 | 3 | 3 | 7 | 6 | 8 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 32 | 3 | 2 | 10 | 0 | 1 | 3 | 10 | 4 | 19 | 7 | 5 | 9 |
| 33 | 2 | 0 | 3 | 1 | 2 | 2 | 8 | 1 | 3 | 5 | 0 | 3 |
| 34 | 5 | 5 | 4 | 1 | 8 | 5 | 15 | 13 | 6 | 8 | 11 | 11 |
| 35 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 4 | 8 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| 36 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 9 | 11 | 3 | 9 | 6 | 8 |
| 37 | 18 | 19 | 18 | 20 | 21 | 19 | 18 | 7 | 4 | 11 | 11 | 10 |
| 38 | 3 | 0 | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 7 | 7 | 3 | 3 | 4 |
| 39 | 12 | 7 | 16 | 11 | 8 | 11 | 2 | 10 | 2 | 4 | 4 | 4 |
| 40 | 10 | 2 | 3 | 4 | 5 | 5 | 7 | 6 | 9 | 17 | 10 | 10 |
| 41 | 9 | 6 | 10 | 5 | 8 | 8 | 6 | 10 | 3 | 13 | 14 | 9 |
| 42 | 18 | 15 | 11 | 19 | 16 | 16 | 15 | 14 | 16 | 15 | 12 | 14 |
| 43 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 | 2 | 2 | 4 | 1 | 3 |
| 44 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 7 | 0 | 9 | 1 | 4 |
| 45 | 6 | 10 | 15 | 17 | 13 | 12 | 5 | 19 | 5 | 10 | 10 | 10 |
| 46 | 0 | 3 | 4 | 1 | 1 | 2 | 6 | 5 | 3 | 2 | 7 | 5 |
| 47 | 2 | 2 | 3 | 6 | 3 | 3 | 2 | 5 | 6 | 11 | 10 | 7 |
| 48 | 1 | 3 | 3 | 0 | 3 | 2 | 6 | 3 | 8 | 4 | 2 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 49 | 4 | 0 | 4 | 0 | 2 | 2 | 5 | 12 | 11 | 6 | 2 | 7 |
| 50 | 19 | 15 | 8 | 4 | 1 | 9 | 13 | 20 | 14 | 17 | 27 | 18 |
| 51 | 6 | 2 | 14 | 8 | 8 | 8 | 8 | 22 | 10 | 20 | 14 | 15 |
| 52 | 5 | 5 | 8 | 1 | 8 | 5 | 10 | 6 | 7 | 15 | 7 | 9 |
| 53 | 10 | 6 | 10 | 4 | 5 | 7 | 9 | 8 | 8 | 17 | 9 | 10 |
| 54 | 9 | 12 | 11 | 3 | 11 | 9 | 5 | 5 | 3 | 4 | 5 | 4 |
| 55 | 10 | 12 | 8 | 14 | 10 | 11 | 5 | 18 | 21 | 12 | 16 | 14 |
| 56 | 4 | 3 | 5 | 4 | 1 | 3 | 7 | 10 | 1 | 9 | 9 | 7 |
| 57 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 9 | 3 | 2 | 3 |
| 58 | 5 | 11 | 3 | 13 | 19 | 10 | 12 | 10 | 14 | 19 | 14 | 14 |
| 59 | 6 | 4 | 8 | 5 | 5 | 6 | 7 | 6 | 14 | 2 | 6 | 7 |
| 60 | 12 | 5 | 8 | 3 | 8 | 7 | 12 | 36 | 23 | 27 | 15 | 23 |
| 61 | 3 | 8 | 8 | 6 | 3 | 6 | 5 | 8 | 11 | 6 | 6 | 7 |
| 62 | 3 | 8 | 15 | 6 | 5 | 7 | 15 | 9 | 8 | 9 | 9 | 10 |
| 63 | 2 | 0 | 5 | 11 | 2 | 4 | 8 | 10 | 11 | 11 | 9 | 10 |
| 64 | 4 | 6 | 24 | 11 | 13 | 12 | 17 | 23 | 12 | 14 | 20 | 17 |
| 65 | 3 | 9 | 8 | 4 | 4 | 6 | 6 | 6 | 5 | 4 | 2 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 66 | 12 | 3 | 11 | 9 | 11 | 9 | 16 | 22 | 18 | 4 | 20 | 16 |
| 67 | 11 | 22 | 18 | 15 | 2 | 14 | 6 | 4 | 0 | 4 | 13 | 5 |
| 68 | 13 | 2 | 15 | 20 | 19 | 14 | 2 | 10 | 4 | 5 | 3 | 5 |
| 69 | 7 | 10 | 4 | 9 | 7 | 7 | 2 | 10 | 5 | 10 | 11 | 8 |
| 70 | 9 | 19 | 17 | 9 | 11 | 13 | 6 | 3 | 3 | 1 | 3 | 3 |
| 71 | 3 | 4 | 1 | 9 | 6 | 5 | 3 | 4 | 3 | 7 | 4 | 4 |
| 72 | 11 | 4 | 9 | 11 | 5 | 8 | 6 | 6 | 7 | 13 | 4 | 7 |

Anexo B. Contagem de brotos e vasos sanguíneos marcados pelo endotélio na interface

| Contagem de brotos e vasos sanguíneos marcados pelo endotélio | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|----|---|---|---|-------|---|---|---|---|---|-------|
| CASO | Interface | | | | | | | | | | | |
| | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 1 | 1 | 10 | 2 | 1 | 6 | 4 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 2 | 3 | 6 | 6 | 0 | 3 | 4 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| 3 | 4 | 0 | 4 | 7 | 7 | 4 | 4 | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 |
| 4 | 6 | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | 3 | 7 | 8 | 3 | 9 | 6 | 4 | 4 | 3 | 0 | 7 | 4 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|---|----|---|---|-------|
| | 1 | 4 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 6 | 4 | 1 | 6 | 8 | 4 | 5 | 3 | 2 | 3 | 0 | 2 | 2 |
| 7 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 4 | 0 | 4 | 2 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 5 | 0 | 4 | 2 |
| 9 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | 5 | 6 | 10 | 1 | 2 | 5 | 2 | 2 | 7 | 0 | 1 | 2 |
| 11 | 2 | 4 | 3 | 4 | 1 | 3 | 2 | 1 | 0 | 9 | 5 | 3 |
| 12 | 5 | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 | 7 | 2 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| 13 | 0 | 1 | 1 | 6 | 1 | 2 | 9 | 4 | 5 | 2 | 1 | 4 |
| 14 | 6 | 10 | 6 | 6 | 11 | 8 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 15 | 3 | 3 | 6 | 11 | 2 | 5 | 8 | 3 | 5 | 3 | 2 | 4 |
| 16 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1 | 1 | 4 | 6 | 10 | 1 | 7 | 6 |
| 17 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 |
| 18 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 0 | 3 |
| 19 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 6 | 0 | 4 | 3 |
| 20 | 1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 1 | 6 | 6 | 10 | 3 | 5 | 6 |
| 21 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 5 | 2 | 1 | 0 | 3 |
| 22 | 1 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 8 | 4 | 6 | 5 | 4 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|---|---|---|---|-------|---|---|---|---|---|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 23 | 0 | 1 | 2 | 0 | 4 | 1 | 1 | 5 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| 24 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 5 | 4 | 2 | 2 | 7 | 4 |
| 25 | 3 | 2 | 1 | 3 | 6 | 3 | 5 | 7 | 5 | 3 | 3 | 5 |
| 26 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 | 4 | 6 | 3 | 2 | 4 | 4 |
| 27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 0 | 6 | 4 |
| 28 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 6 | 2 | 3 | 9 | 4 | 5 |
| 29 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 |
| 30 | 8 | 5 | 5 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 6 | 4 | 3 | 4 |
| 31 | 3 | 1 | 7 | 1 | 3 | 3 | 7 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| 32 | 0 | 5 | 2 | 0 | 4 | 2 | 1 | 3 | 8 | 9 | 4 | 5 |
| 33 | 0 | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 8 | 7 | 3 | 1 | 0 | 4 |
| 34 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 7 | 2 | 5 | 5 | 2 | 4 |
| 35 | 2 | 4 | 2 | 3 | 1 | 2 | 5 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 3 | 5 | 0 | 3 |
| 37 | 0 | 2 | 1 | 5 | 7 | 3 | 0 | 0 | 1 | 3 | 4 | 2 |
| 38 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 4 | 3 | 1 | 4 | 7 | 4 |
| 39 | 2 | 3 | 2 | 1 | 4 | 2 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|---|---|---|---|-------|---|---|---|---|---|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 40 | 2 | 3 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 2 |
| 41 | 3 | 0 | 5 | 5 | 4 | 3 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| 42 | 0 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 5 | 1 | 0 | 9 | 3 |
| 43 | 2 | 4 | 3 | 2 | 4 | 3 | 4 | 3 | 2 | 4 | 4 | 3 |
| 44 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | 6 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 45 | 0 | 4 | 2 | 2 | 9 | 3 | 7 | 0 | 5 | 1 | 5 | 4 |
| 46 | 0 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 5 | 3 | 2 | 4 | 5 | 4 |
| 47 | 2 | 1 | 4 | 3 | 0 | 2 | 3 | 4 | 6 | 3 | 1 | 3 |
| 48 | 2 | 4 | 0 | 1 | 3 | 2 | 5 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 49 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | 9 | 4 | 5 | 4 |
| 50 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 4 | 5 | 8 | 7 | 0 | 5 |
| 51 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 7 | 2 |
| 52 | 0 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 6 | 4 | 3 |
| 53 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 4 | 3 |
| 54 | 4 | 7 | 6 | 4 | 6 | 5 | 8 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| 55 | 7 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 10 | 4 | 3 | 3 | 7 | 5 |
| 56 | 5 | 8 | 6 | 6 | 9 | 7 | 3 | 2 | 5 | 8 | 5 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|---|---|---|---|-------|---|----|---|---|---|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 57 | 3 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 2 | 4 | 3 |
| 58 | 2 | 3 | 3 | 3 | 7 | 4 | 7 | 4 | 8 | 2 | 3 | 5 |
| 59 | 4 | 1 | 1 | 6 | 3 | 3 | 5 | 2 | 7 | 7 | 3 | 5 |
| 60 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 7 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| 61 | 1 | 0 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 4 | 2 | 4 | 7 | 4 |
| 62 | 1 | 6 | 2 | 3 | 0 | 2 | 4 | 6 | 1 | 5 | 6 | 4 |
| 63 | 1 | 2 | 5 | 2 | 4 | 3 | 9 | 6 | 2 | 1 | 3 | 4 |
| 64 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 1 | 4 | 0 | 2 | 4 | 4 | 3 |
| 65 | 0 | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 66 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 67 | 6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 68 | 10 | 9 | 5 | 1 | 0 | 5 | 6 | 5 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 69 | 2 | 0 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 70 | 2 | 5 | 3 | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 71 | 4 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | 2 | 10 | 6 | 3 | 7 | 6 |
| 72 | 6 | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 | 6 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 |

Anexo C. Contagem de brotos e vasos sanguíneos marcados pelo endotélio no parênquima

| Contagem de brotos e vasos sanguíneos marcados pelo endotélio | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| CASO | Parênquima | | | | | | | | | | | |
| | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 1 | 6 | 2 | 6 | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 3 | 4 | 9 | 4 |
| 2 | 6 | 21 | 9 | 10 | 12 | 12 | 5 | 4 | 23 | 19 | 6 | 11 |
| 3 | 8 | 15 | 32 | 22 | 25 | 20 | 14 | 4 | 8 | 4 | 12 | 8 |
| 4 | 7 | 5 | 9 | 9 | 9 | 8 | 3 | 4 | 8 | 7 | 11 | 7 |
| 5 | 15 | 6 | 17 | 7 | 7 | 10 | 17 | 5 | 4 | 13 | 12 | 10 |
| 6 | 2 | 4 | 6 | 8 | 4 | 5 | 9 | 5 | 16 | 3 | 3 | 7 |
| 7 | 6 | 2 | 2 | 0 | 1 | 2 | 8 | 5 | 1 | 3 | 3 | 4 |
| 8 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5 | 4 | 1 | 6 | 2 | 4 |
| 9 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | 5 | 7 | 3 | 9 | 17 | 8 | 3 | 8 | 3 | 14 | 4 | 6 |
| 11 | 8 | 5 | 11 | 7 | 2 | 7 | 1 | 5 | 0 | 3 | 5 | 3 |
| 12 | 2 | 5 | 19 | 7 | 6 | 8 | 7 | 5 | 11 | 7 | 2 | 6 |
| 13 | 5 | 5 | 4 | 10 | 9 | 7 | 10 | 10 | 7 | 1 | 4 | 6 |
| 14 | 4 | 3 | 3 | 13 | 4 | 5 | 10 | 4 | 7 | 3 | 5 | 6 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 15 | 8 | 7 | 14 | 12 | 9 | 10 | 17 | 12 | 10 | 7 | 4 | 10 |
| 16 | 3 | 3 | 2 | 3 | 7 | 4 | 9 | 9 | 7 | 18 | 0 | 9 |
| 17 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 18 | 2 | 3 | 1 | 6 | 1 | 3 | 9 | 6 | 8 | 21 | 8 | 10 |
| 19 | 2 | 3 | 5 | 3 | 3 | 3 | 5 | 12 | 7 | 12 | 9 | 9 |
| 20 | 8 | 5 | 5 | 1 | 1 | 4 | 17 | 11 | 13 | 19 | 15 | 15 |
| 21 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 2 | 9 | 9 | 5 | 9 | 13 | 9 |
| 22 | 11 | 7 | 17 | 12 | 13 | 12 | 6 | 2 | 7 | 4 | 3 | 4 |
| 23 | 6 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 5 | 9 | 9 | 5 | 6 |
| 24 | 9 | 7 | 6 | 2 | 6 | 6 | 9 | 11 | 20 | 11 | 6 | 11 |
| 25 | 8 | 11 | 6 | 3 | 4 | 6 | 26 | 6 | 13 | 15 | 16 | 15 |
| 26 | 13 | 5 | 12 | 1 | 4 | 7 | 8 | 16 | 20 | 28 | 16 | 18 |
| 27 | 9 | 3 | 1 | 4 | 0 | 3 | 6 | 15 | 14 | 5 | 7 | 9 |
| 28 | 3 | 7 | 3 | 7 | 1 | 4 | 10 | 2 | 10 | 3 | 3 | 6 |
| 29 | 1 | 3 | 4 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 12 | 6 | 15 | 8 |
| 30 | 3 | 4 | 2 | 3 | 6 | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 31 | 1 | 2 | 2 | 12 | 2 | 4 | 9 | 6 | 7 | 6 | 9 | 7 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|---|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 32 | 6 | 1 | 4 | 2 | 4 | 3 | 4 | 6 | 6 | 7 | 5 | 6 |
| 33 | 21 | 3 | 6 | 5 | 7 | 8 | 1 | 2 | 9 | 13 | 3 | 6 |
| 34 | 1 | 6 | 12 | 21 | 14 | 11 | 18 | 7 | 3 | 7 | 4 | 8 |
| 35 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 7 | 7 | 3 | 5 | 5 | 5 |
| 36 | 2 | 0 | 8 | 0 | 2 | 2 | 7 | 6 | 0 | 9 | 3 | 5 |
| 37 | 3 | 0 | 1 | 4 | 4 | 2 | 14 | 7 | 8 | 8 | 8 | 9 |
| 38 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 9 | 7 | 5 | 8 | 7 |
| 39 | 3 | 4 | 4 | 10 | 3 | 5 | 3 | 5 | 2 | 6 | 1 | 3 |
| 40 | 3 | 2 | 4 | 2 | 2 | 3 | 14 | 9 | 3 | 8 | 10 | 9 |
| 41 | 4 | 3 | 6 | 5 | 2 | 4 | 13 | 4 | 7 | 8 | 10 | 8 |
| 42 | 0 | 1 | 4 | 0 | 2 | 1 | 25 | 35 | 25 | 37 | 25 | 29 |
| 43 | 11 | 5 | 6 | 1 | 4 | 5 | 17 | 16 | 16 | 19 | 10 | 16 |
| 44 | 2 | 3 | 2 | 4 | 2 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 11 | 6 |
| 45 | 3 | 3 | 7 | 2 | 2 | 3 | 16 | 21 | 7 | 7 | 5 | 11 |
| 46 | 3 | 3 | 0 | 5 | 1 | 2 | 5 | 9 | 8 | 11 | 5 | 8 |
| 47 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 | 8 | 4 | 7 | 13 | 12 | 9 |
| 48 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 9 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 49 | 12 | 7 | 4 | 10 | 7 | 8 | 6 | 6 | 4 | 6 | 11 | 7 |
| 50 | 7 | 6 | 3 | 0 | 2 | 4 | 8 | 3 | 4 | 9 | 10 | 7 |
| 51 | 6 | 1 | 4 | 5 | 11 | 5 | 5 | 10 | 7 | 0 | 2 | 5 |
| 52 | 8 | 15 | 16 | 23 | 4 | 13 | 6 | 7 | 1 | 5 | 8 | 5 |
| 53 | 6 | 12 | 5 | 11 | 10 | 9 | 8 | 8 | 9 | 1 | 2 | 6 |
| 54 | 10 | 17 | 11 | 14 | 11 | 13 | 4 | 0 | 10 | 7 | 5 | 5 |
| 55 | 7 | 14 | 17 | 20 | 11 | 14 | 22 | 5 | 5 | 1 | 0 | 7 |
| 56 | 16 | 9 | 20 | 27 | 15 | 17 | 7 | 6 | 5 | 3 | 0 | 4 |
| 57 | 14 | 9 | 19 | 10 | 18 | 14 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 4 |
| 58 | 9 | 2 | 0 | 10 | 0 | 4 | 9 | 10 | 11 | 6 | 12 | 10 |
| 59 | 0 | 14 | 11 | 27 | 10 | 12 | 21 | 4 | 1 | 3 | 19 | 10 |
| 60 | 2 | 24 | 0 | 4 | 5 | 7 | 5 | 5 | 14 | 8 | 14 | 9 |
| 61 | 4 | 4 | 4 | 16 | 11 | 8 | 8 | 7 | 4 | 3 | 2 | 5 |
| 62 | 21 | 15 | 14 | 14 | 22 | 17 | 4 | 4 | 7 | 8 | 3 | 5 |
| 63 | 37 | 15 | 25 | 22 | 24 | 25 | 9 | 7 | 14 | 13 | 5 | 10 |
| 64 | 9 | 2 | 1 | 12 | 8 | 6 | 2 | 9 | 13 | 7 | 8 | 8 |
| 65 | 9 | 4 | 5 | 11 | 8 | 7 | 1 | 4 | 3 | 0 | 1 | 2 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 66 | 16 | 8 | 13 | 15 | 7 | 12 | 1 | 6 | 4 | 1 | 0 | 2 |
| 67 | 1 | 7 | 4 | 3 | 0 | 3 | 4 | 0 | 2 | 2 | 5 | 3 |
| 68 | 13 | 15 | 7 | 10 | 12 | 11 | 8 | 2 | 5 | 16 | 11 | 8 |
| 69 | 6 | 3 | 3 | 10 | 6 | 6 | 6 | 2 | 2 | 5 | 8 | 5 |
| 70 | 3 | 24 | 5 | 20 | 12 | 13 | 4 | 11 | 5 | 4 | 8 | 6 |
| 71 | 12 | 16 | 22 | 14 | 16 | 16 | 22 | 14 | 14 | 11 | 10 | 14 |
| 72 | 4 | 10 | 15 | 8 | 10 | 9 | 7 | 3 | 2 | 5 | 2 | 4 |

Anexo D. Média da semi-quantificação dos vasos sanguíneos marcados pelo endotélio muscularizado nos espaços porta e no parênquima

| Média da semi-quantificação dos vasos sanguíneos marcados pelo endotélio muscularizado | | |
|--|--------------|------------|
| CASO | Espaço porta | Parênquima |
| | Vasos | Vasos |
| | Média | Média |
| 1 | 2 | 0 |
| 2 | 2 | 0 |
| 3 | 2 | 1 |

| CASO | Espaço porta | Parênquima |
|------|--------------|------------|
| | Vasos | Vasos |
| | Média | Média |
| 4 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 0 |
| 6 | 1 | 0 |
| 7 | 1 | 0 |
| 8 | 2 | 0 |
| 9 | 1 | 0 |
| 10 | 1 | 0 |
| 11 | 1 | 0 |
| 12 | 2 | 0 |
| 13 | 2 | 0 |
| 14 | 2 | 0 |
| 15 | 2 | 1 |
| 16 | 0 | 0 |
| 17 | 2 | 0 |
| 18 | 1 | 0 |
| 19 | 2 | 0 |

| CASO | Espaço porta | Parênquima |
|------|--------------|------------|
| | Vasos | Vasos |
| | Média | Média |
| 20 | 2 | 0 |
| 21 | 2 | 0 |
| 22 | 1 | 0 |
| 23 | 0 | 0 |
| 24 | 2 | 0 |
| 25 | 1 | 0 |
| 26 | 1 | 0 |
| 27 | 1 | 0 |
| 28 | 0 | 0 |
| 29 | 2 | 0 |
| 30 | 0 | 0 |
| 31 | 1 | 0 |
| 32 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 0 |
| 34 | 1 | 0 |
| 35 | 0 | 0 |

| CASO | Espaço porta | Parênquima |
|------|--------------|------------|
| | Vasos | Vasos |
| | Média | Média |
| 36 | 1 | 0 |
| 37 | 2 | 0 |
| 38 | 0 | 0 |
| 39 | 0 | 0 |
| 40 | 1 | 0 |
| 41 | 1 | 0 |
| 42 | 2 | 2 |
| 43 | 1 | 0 |
| 44 | 1 | 0 |
| 45 | 0 | 0 |
| 46 | 1 | 1 |
| 47 | 1 | 0 |
| 48 | 0 | 0 |
| 49 | 0 | 0 |
| 50 | 2 | 0 |
| 51 | 1 | 0 |

| CASO | Espaço porta | Parênquima |
|------|--------------|------------|
| | Vasos | Vasos |
| | Média | Média |
| 52 | 1 | 1 |
| 53 | 1 | 0 |
| 54 | 1 | 0 |
| 55 | 1 | 0 |
| 56 | 0 | 0 |
| 57 | 1 | 0 |
| 58 | 1 | 0 |
| 59 | 0 | 0 |
| 60 | 1 | 0 |
| 61 | 0 | 0 |
| 62 | 1 | 0 |
| 63 | 1 | 0 |
| 64 | 0 | 0 |
| 65 | 0 | 0 |
| 66 | 2 | 0 |
| 67 | 2 | 0 |

| CASO | Espaço porta | Parênquima |
|------|--------------|------------|
| | Vasos | Vasos |
| | Média | Média |
| 68 | 1 | 0 |
| 69 | 1 | 0 |
| 70 | 1 | 0 |
| 71 | 1 | 0 |
| 72 | 1 | 0 |

Anexo E. Contagem de brotos e vasos linfáticos marcados pelo endotélio no espaço porta

| Contagem de brotos e vasos linfáticos marcados pelo endotélio | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|----|----|----|----|-------|---|---|---|---|---|-------|
| CASO | Espaços Porta | | | | | | | | | | | |
| | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 1 | 6 | 6 | 5 | 10 | 22 | 10 | 2 | 1 | 1 | 1 | 5 | 2 |
| 2 | 3 | 3 | 8 | 3 | 2 | 4 | 2 | 1 | 5 | 0 | 0 | 2 |
| 3 | 9 | 13 | 14 | 14 | 8 | 12 | 10 | 4 | 6 | 4 | 2 | 5 |
| 4 | 5 | 10 | 6 | 4 | 5 | 6 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 |

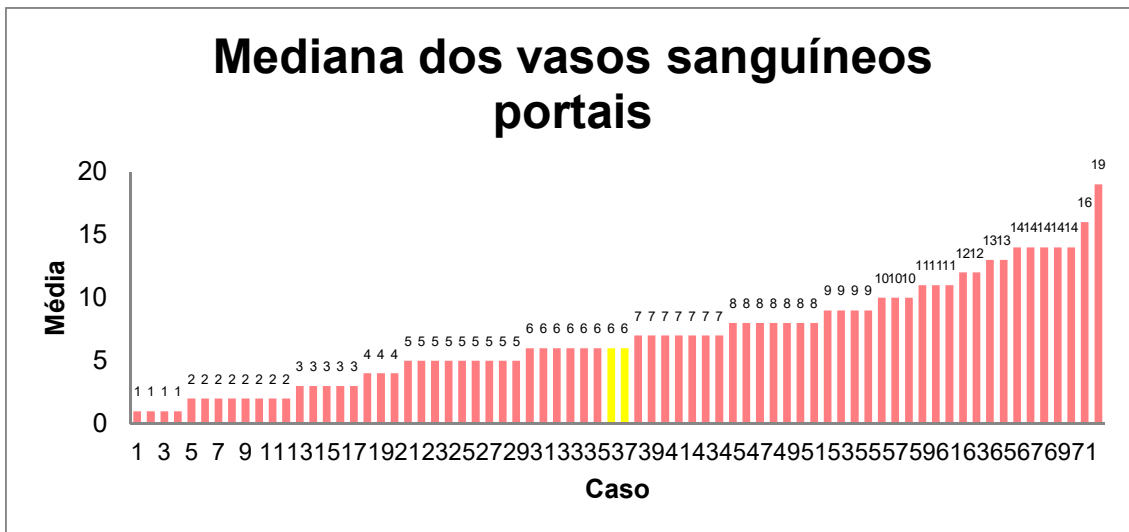
| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|---|----|---|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 5 | 14 | 6 | 14 | 5 | 3 | 8 | 3 | 3 | 1 | 4 | 1 | 2 |
| 6 | 3 | 7 | 7 | 4 | 2 | 5 | 3 | 0 | 0 | 4 | 1 | 2 |
| 7 | 5 | 12 | 6 | 8 | 7 | 8 | 1 | 1 | 3 | 4 | 3 | 2 |
| 8 | 11 | 11 | 12 | 17 | 13 | 13 | 13 | 9 | 1 | 3 | 1 | 5 |
| 9 | 4 | 7 | 4 | 13 | 16 | 9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 6 | 8 | 13 | 5 | 5 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 11 | 4 | 16 | 14 | 13 | 6 | 11 | 3 | 7 | 2 | 1 | 6 | 4 |
| 12 | 7 | 7 | 4 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 12 | 10 | 7 | 4 | 11 | 9 | 2 | 0 | 0 | 7 | 5 | 3 |
| 14 | 8 | 15 | 9 | 6 | 5 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| 15 | 4 | 14 | 12 | 4 | 5 | 8 | 1 | 7 | 7 | 2 | 0 | 3 |
| 16 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 8 | 8 | 8 | 18 | 13 | 11 | 1 | 3 | 11 | 1 | 6 | 4 |
| 18 | 14 | 11 | 13 | 5 | 10 | 11 | 22 | 5 | 4 | 5 | 10 | 9 |
| 19 | 5 | 7 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| 20 | 1 | 7 | 3 | 3 | 10 | 5 | 5 | 8 | 9 | 2 | 7 | 6 |
| 21 | 8 | 9 | 8 | 8 | 12 | 9 | 5 | 3 | 5 | 5 | 7 | 5 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|---|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 22 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| 23 | 13 | 8 | 7 | 11 | 6 | 9 | 4 | 8 | 5 | 1 | 8 | 5 |
| 24 | 5 | 6 | 11 | 23 | 7 | 10 | 7 | 19 | 3 | 16 | 6 | 10 |
| 25 | 4 | 6 | 9 | 9 | 4 | 6 | 2 | 1 | 4 | 4 | 12 | 5 |
| 26 | 5 | 17 | 11 | 12 | 13 | 12 | 12 | 3 | 9 | 4 | 10 | 8 |
| 27 | 5 | 3 | 8 | 3 | 6 | 5 | 11 | 7 | 9 | 12 | 21 | 12 |
| 28 | 3 | 1 | 3 | 9 | 13 | 6 | 7 | 0 | 0 | 1 | 6 | 3 |
| 29 | 15 | 13 | 20 | 19 | 18 | 17 | 2 | 5 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| 30 | 3 | 6 | 2 | 3 | 2 | 3 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 31 | 5 | 1 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 32 | 1 | 3 | 1 | 3 | 0 | 2 | 0 | 5 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 33 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 |
| 34 | 4 | 5 | 4 | 3 | 2 | 4 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 35 | 2 | 2 | 6 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 1 |
| 36 | 9 | 8 | 1 | 4 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | 10 | 11 | 14 | 10 | 10 | 11 | 8 | 2 | 3 | 4 | 14 | 6 |
| 38 | 2 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 5 | 1 | 5 | 2 | 4 | 3 |

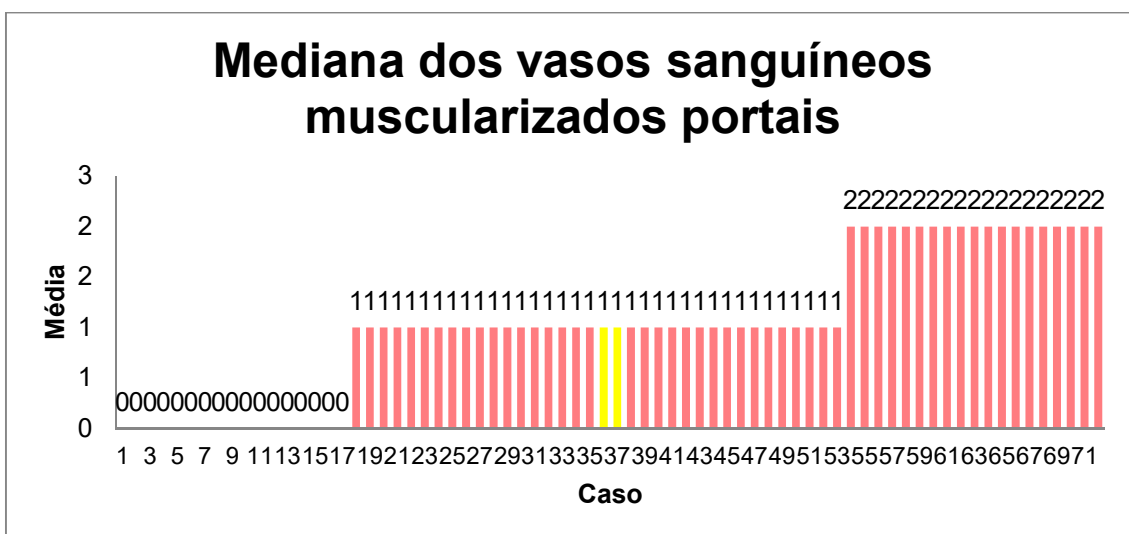
| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|---|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 39 | 5 | 5 | 6 | 9 | 7 | 6 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 1 |
| 40 | 1 | 2 | 4 | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | 12 | 2 | 8 | 5 | 10 | 7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| 42 | 23 | 10 | 17 | 20 | 10 | 16 | 4 | 9 | 4 | 2 | 11 | 6 |
| 43 | 1 | 3 | 1 | 8 | 3 | 3 | 4 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 44 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | 4 | 15 | 12 | 2 | 3 | 7 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 |
| 46 | 1 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 0 | 6 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| 47 | 5 | 3 | 5 | 5 | 3 | 4 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 48 | 12 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| 49 | 1 | 7 | 5 | 0 | 1 | 3 | 2 | 11 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| 50 | 8 | 7 | 7 | 12 | 0 | 7 | 3 | 4 | 8 | 11 | 25 | 10 |
| 51 | 7 | 4 | 4 | 3 | 7 | 5 | 2 | 3 | 2 | 0 | 5 | 2 |
| 52 | 10 | 15 | 11 | 8 | 8 | 10 | 8 | 13 | 5 | 6 | 9 | 8 |
| 53 | 17 | 15 | 32 | 10 | 16 | 18 | 4 | 7 | 6 | 2 | 1 | 4 |
| 54 | 10 | 10 | 14 | 7 | 13 | 11 | 4 | 5 | 2 | 2 | 1 | 3 |
| 55 | 25 | 8 | 10 | 34 | 16 | 19 | 3 | 4 | 5 | 7 | 3 | 4 |

| CASO | Quantidade de vasos | | | | | | Quantidade de células isoladas - brotos | | | | | |
|------|---------------------|----|----|----|----|-------|---|----|---|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média |
| 56 | 10 | 6 | 4 | 10 | 12 | 8 | 0 | 2 | 2 | 0 | 8 | 2 |
| 57 | 7 | 4 | 4 | 13 | 4 | 6 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 58 | 13 | 17 | 11 | 19 | 15 | 15 | 10 | 7 | 2 | 7 | 10 | 7 |
| 59 | 1 | 2 | 4 | 14 | 7 | 6 | 2 | 0 | 1 | 4 | 1 | 2 |
| 60 | 5 | 6 | 8 | 10 | 6 | 7 | 17 | 8 | 9 | 23 | 4 | 12 |
| 61 | 1 | 2 | 2 | 9 | 4 | 4 | 0 | 0 | 5 | 3 | 3 | 2 |
| 62 | 19 | 13 | 21 | 16 | 10 | 16 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| 63 | 9 | 13 | 9 | 13 | 22 | 13 | 1 | 2 | 0 | 7 | 4 | 3 |
| 64 | 7 | 13 | 21 | 11 | 7 | 12 | 8 | 12 | 9 | 2 | 2 | 7 |
| 65 | 15 | 5 | 1 | 22 | 1 | 9 | 2 | 0 | 0 | 3 | 4 | 2 |
| 66 | 12 | 8 | 14 | 12 | 18 | 13 | 5 | 4 | 0 | 0 | 4 | 3 |
| 67 | 10 | 14 | 9 | 6 | 10 | 10 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 1 |
| 68 | 8 | 14 | 15 | 21 | 18 | 15 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 69 | 2 | 2 | 6 | 5 | 3 | 4 | 0 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| 70 | 6 | 5 | 3 | 2 | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 71 | 6 | 8 | 7 | 1 | 3 | 5 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| 72 | 4 | 11 | 4 | 9 | 8 | 7 | 1 | 8 | 4 | 0 | 2 | 3 |

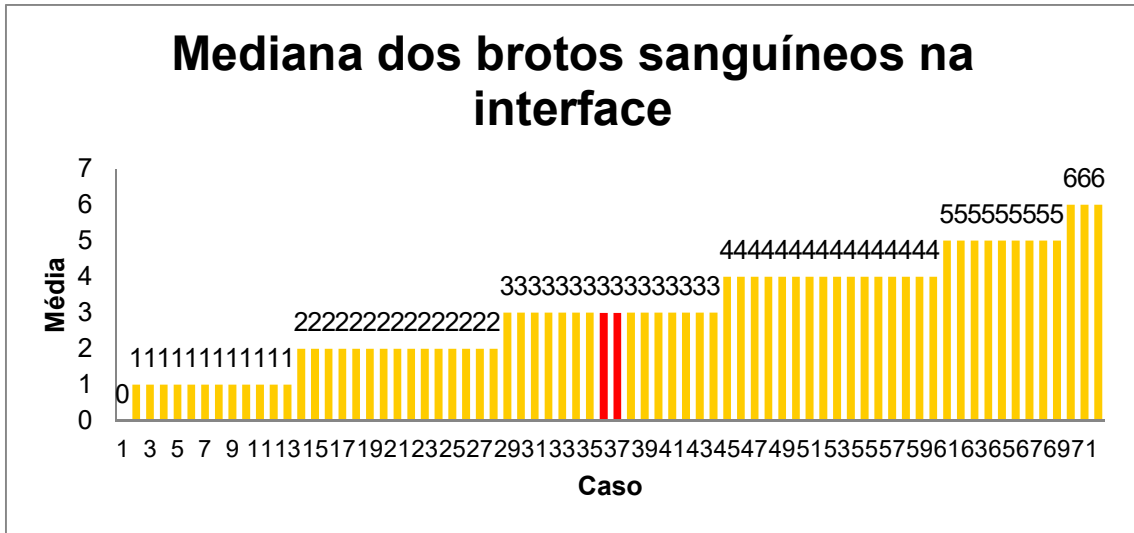
Anexo H. Mediana das médias dos vasos sanguíneos portais



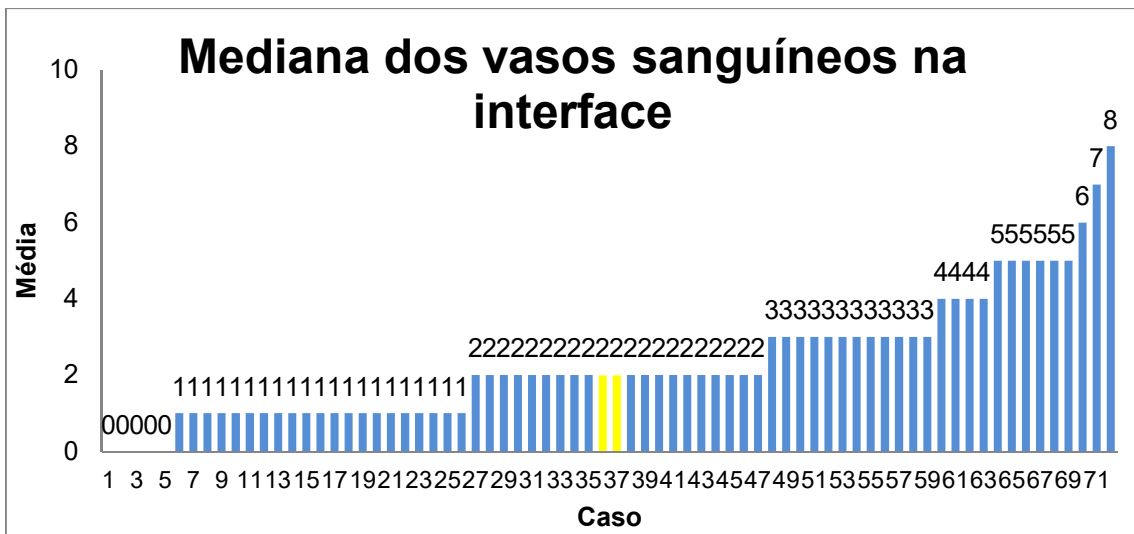
Anexo I. Mediana das médias dos vasos sanguíneos muscularizados portais



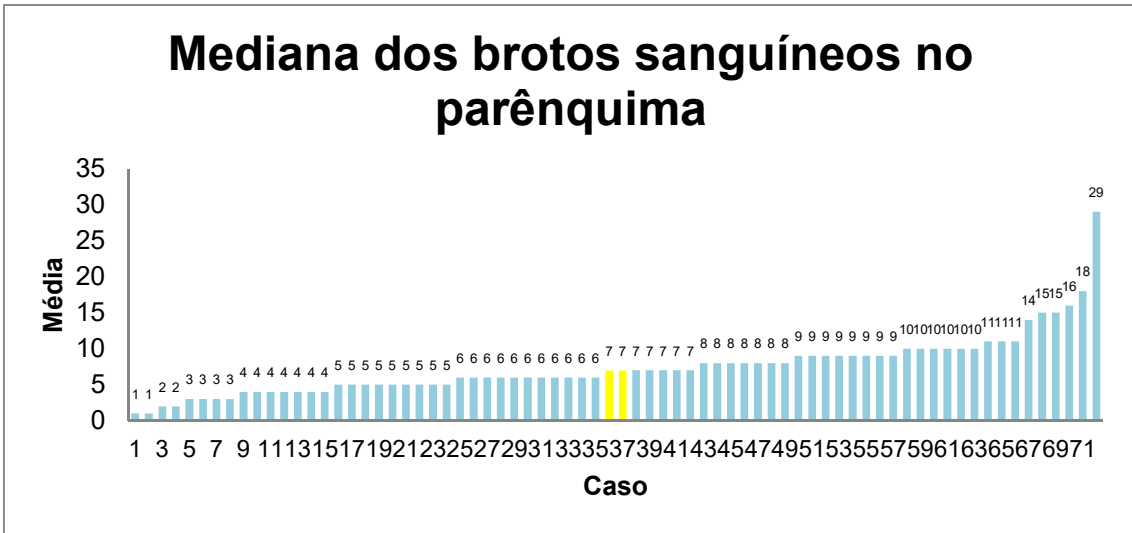
Anexo J. Mediana das médias dos brotos sanguíneos na interface



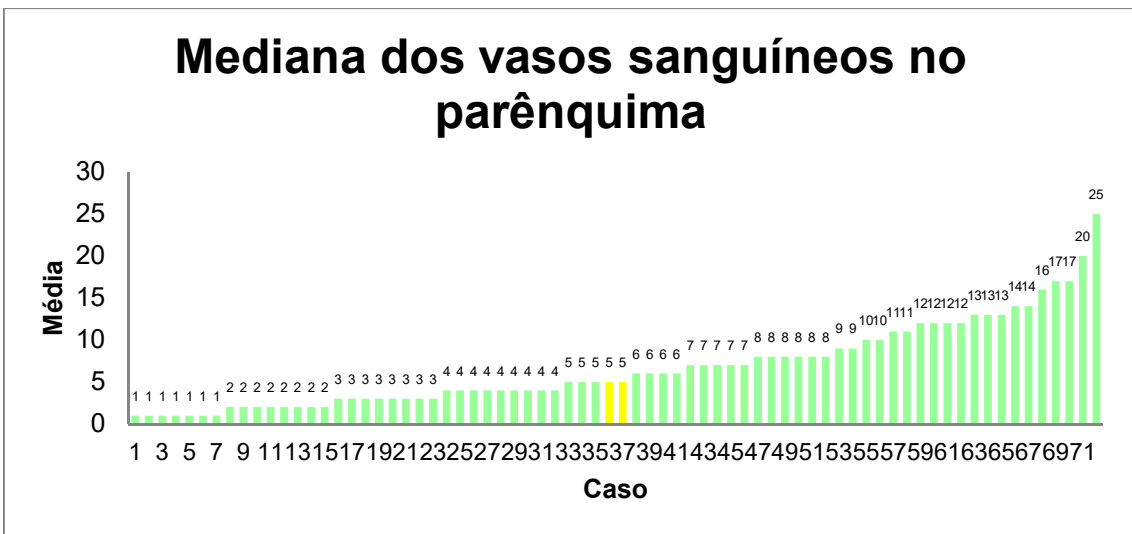
Anexo K. Mediana das médias dos vasos sanguíneos na interface



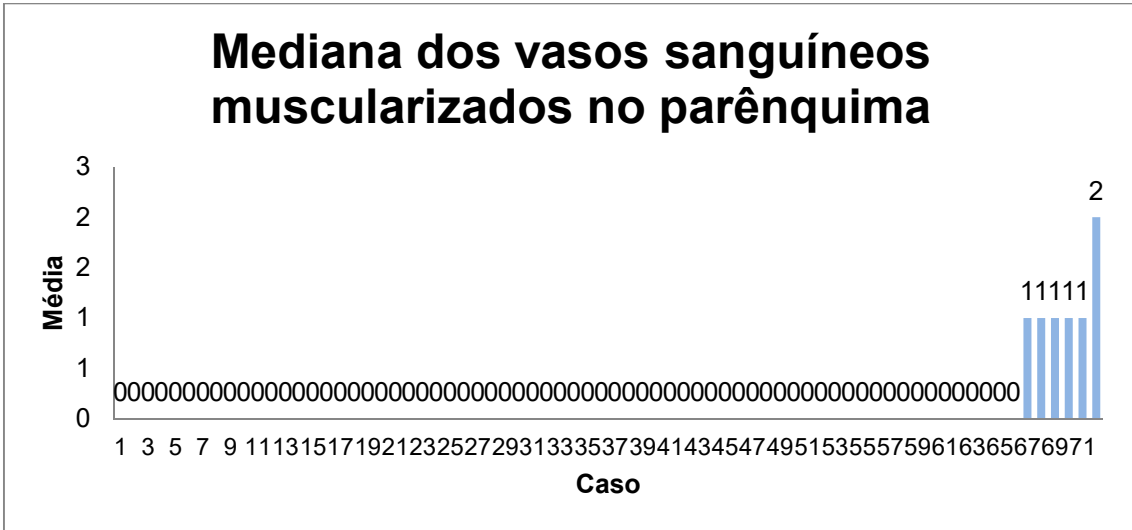
Anexo L. Mediana das médias dos brotos sanguíneos no parênquima



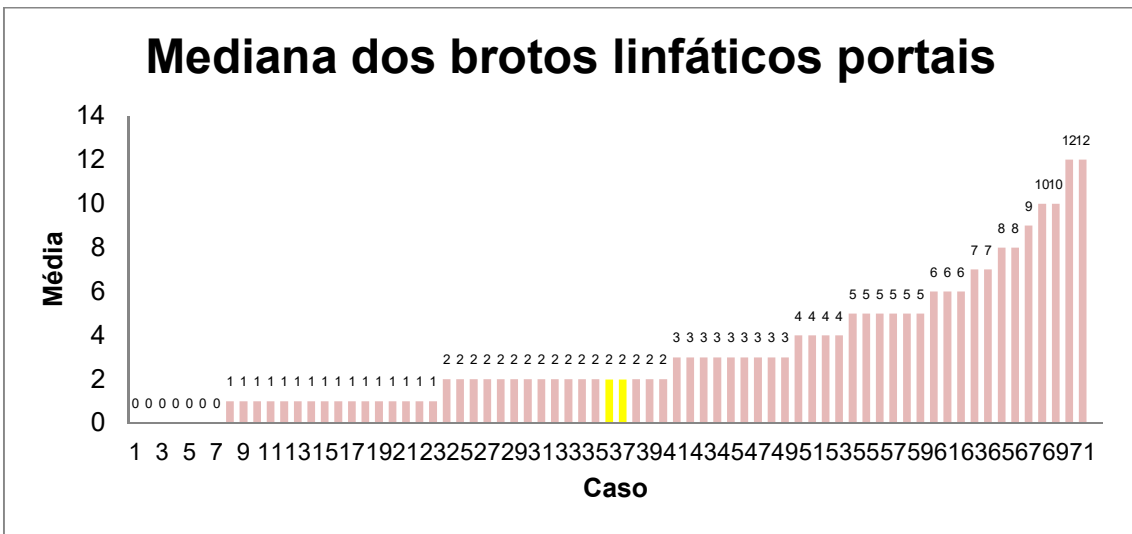
Anexo M. Mediana das médias dos vasos sanguíneos no parênquima



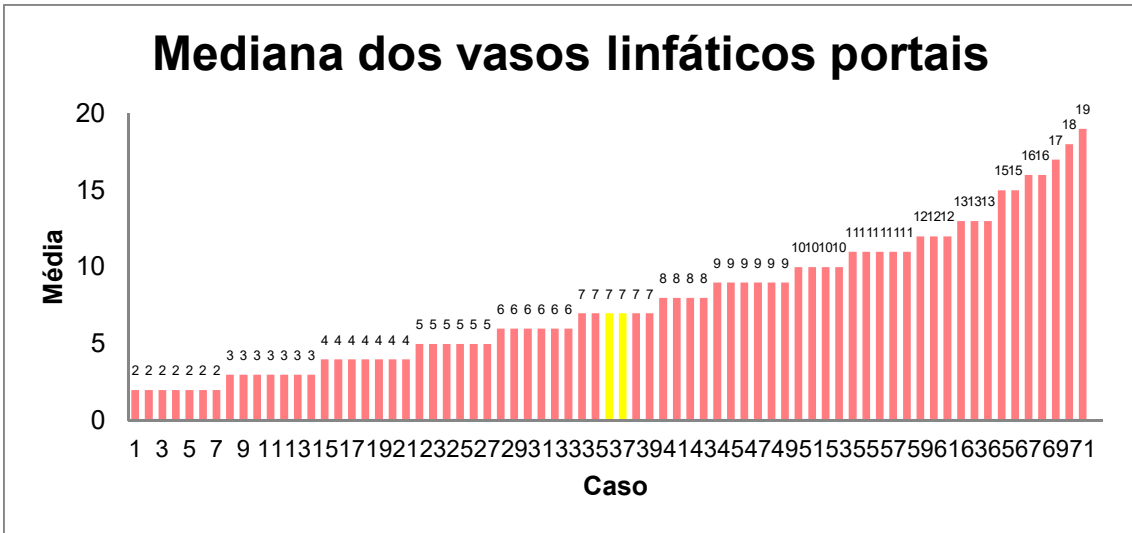
Anexo N. Mediana das médias dos vasos sanguíneos muscularizados no parênquima



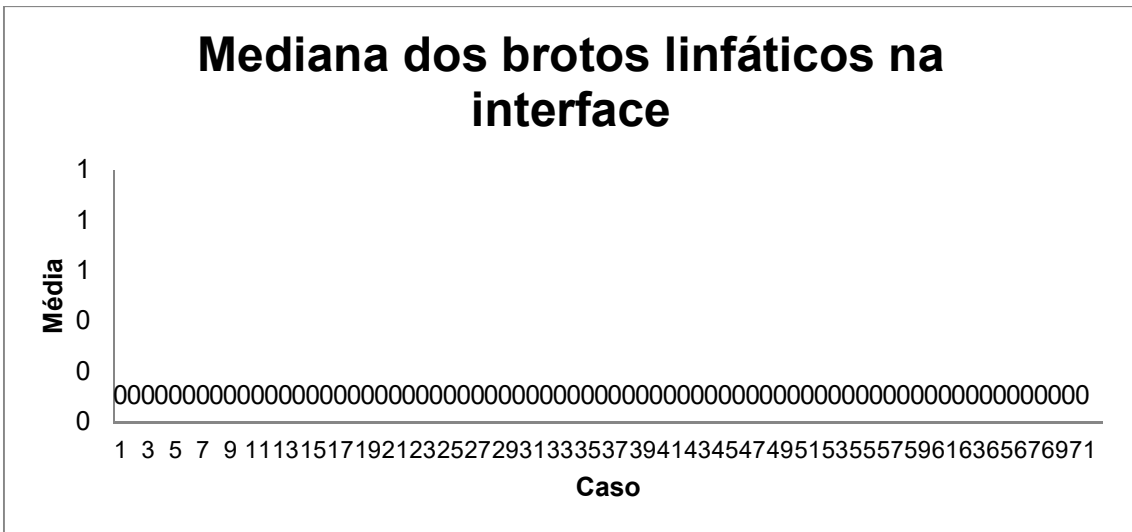
Anexo O. Mediana das médias dos brotos linfáticos portais



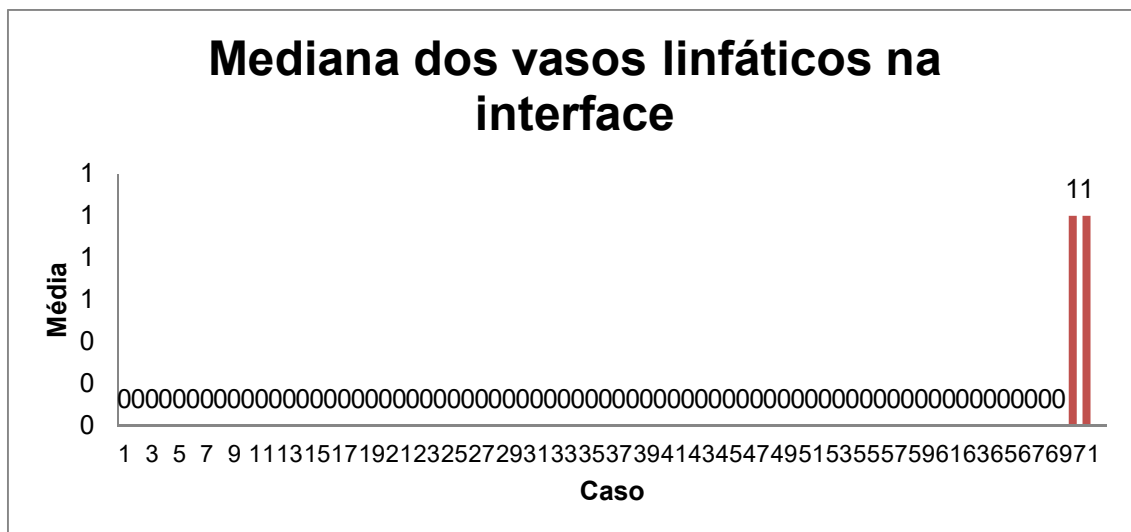
Anexo P. Mediana das médias dos vasos linfáticos portais



Anexo Q. Mediana das médias dos brotos linfáticos na interface



Anexo R. Mediana das médias dos vasos linfáticos na interface



Anexo S. Estadiamento das lesões histopatológicas atribuíveis a hepatite crônica C de acordo com a classificação da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP)

| CASO | ALTERAÇÃO ESTRUTURAL (FIBROSE) (0-4) | INFILTRADO INFLAMATÓRIO PORTAL/SEPTAL (0-4) | ATIVIDADE PERIportal/PERI-SEPTAL (0-4) | ATIVIDADE PARENQUIMATOSA (0-4) |
|------|--------------------------------------|---|--|--------------------------------|
| 1 | 4 | 2 | 3 | 2 |
| 2 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| 3 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| 4 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| 5 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 6 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 7 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| 8 | 4A | 4 | 3 | 3 |
| 9 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| 10 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 11 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 12 | 1 | 2 | 3 | 2 |
| 13 | 4 | 3 | 2 | 2 |
| 14 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 15 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17 | 4C | 3 | 4 | 3 |
| 18 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| 19 | 3 | 2 | 3 | 1 |

| CASO | ALTERAÇÃO ESTRUTURAL (FIBROSE) (0-4) | INFILTRADO INFLAMATÓRIO PORTAL/SEPTAL (0-4) | ATIVIDADE PERIportal/PERI- SEPTAL (0-4) | ATIVIDADE PARENQUIMATOSA (0-4) |
|------|--|--|---|--------------------------------------|
| 20 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| 21 | 4B | 2 | 3 | 2 |
| 22 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 23 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| 24 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 25 | 1 | 3 | 3 | 2 |
| 26 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| 27 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| 28 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 29 | 4C | 2 | 3 | 2 |
| 30 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 31 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 32 | 1 | 2 | 3 | 2 |
| 33 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 34 | 0 | 3 | 2 | 1 |
| 35 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 36 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| 37 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| 38 | 0 | 4 | 2 | 2 |
| 39 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 40 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 41 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 42 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| 43 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| 44 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 45 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| 46 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 47 | 4 | 3 | 3 | 2 |
| 48 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 49 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 50 | 3 | 3 | 4 | 3 |
| 51 | 4A | 2 | 3 | 1 |
| 52 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 53 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 54 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 55 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| 56 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 57 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 58 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| 59 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| 60 | 3 | 3 | 3 | 2 |

| CASO | ALTERAÇÃO ESTRUTURAL (FIBROSE) (0-4) | INFILTRADO INFLAMATÓRIO PORTAL/SEPTAL (0-4) | ATIVIDADE PERIportal/PERI-SEPTAL (0-4) | ATIVIDADE PARENQUIMATOSA (0-4) |
|------|--------------------------------------|---|--|--------------------------------|
| 61 | 3 | 3 | 3 | 1 |
| 62 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 63 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 64 | 3 | 4 | 3 | 2 |
| 65 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| 66 | 4C | 3 | 2 | 1 |
| 67 | 4B | 4 | 3 | 4 |
| 68 | 4C | 3 | 3 | 3 |
| 69 | 4B | 2 | 3 | 3 |
| 70 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 71 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 72 | 2 | 2 | 2 | 1 |

Anexo T. Graduação histológica dos achados de esteatose e balonização de acordo com a classificação das Esteato-hepatites e classificação da fibrose pericelular e perivenular.

| CASO | ESTEATOSE GRADUAÇÃO (0-3) | ESTEATOSE % | ESTEATO-HEPATITE (0-1) | BALONIZAÇÃO (0-2) | FIBROSE PERICELULAR | FIBROSE PERIVENULAR |
|------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 1 | 20 | 0 | 1 | 2 | 99 |
| 2 | 1 | 10 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 7 | 1 | 30 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 1 | 99 | 99 |
| 9 | 2 | 40 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 13 | 1 | 20 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| 14 | 3 | 70 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 15 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 20 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 17 | 2 | 50 | 1 | 2 | 2 | 99 |
| 18 | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 1 | 10 | 0 | 1 | 1 | 1 |

| CASO | ESTEATOSE GRADUAÇÃO (0-3) | ESTEATOSE % | ESTEATO-HEPATITE (0-1) | BALONIZAÇÃO (0-2) | FIBROSE PERICELULAR | FIBROSE PERIVENULAR |
|------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 20 | 2 | 40 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 21 | 1 | 10 | 0 | 2 | 2 | 99 |
| 22 | 1 | 20 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 23 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 24 | 1 | 20 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 25 | 2 | 40 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | 1 | 10 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 29 | 2 | 60 | 1 | 2 | 1 | 99 |
| 30 | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 32 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 34 | 1 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 2 | 50 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | 2 | 50 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 40 | 3 | 70 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 41 | 1 | 10 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| 42 | 3 | 90 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 43 | 1 | 5 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 45 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 46 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | 2 | 60 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 48 | 3 | 80 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 49 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 51 | 1 | 20 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 53 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 54 | 1 | 10 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| 55 | 1 | 20 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 56 | 2 | 50 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| 57 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 58 | 2 | 40 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 59 | 2 | 40 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 60 | 2 | 60 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 61 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 |

| CASO | ESTEATOSE GRADUAÇÃO (0-3) | ESTEATOSE % | ESTEATO-HEPATITE (0-1) | BALONIZAÇÃO (0-2) | FIBROSE PERICELULAR | FIBROSE PERIVENULAR |
|------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 62 | 3 | 70 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 63 | 3 | 80 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 64 | 1 | 10 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| 65 | 1 | 60 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 66 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 67 | 2 | 40 | 1 | 2 | 99 | 99 |
| 68 | 2 | 40 | 1 | 2 | 2 | 99 |
| 69 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 70 | 1 | 30 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| 71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 72 | 1 | 20 | 0 | 1 | 1 | 1 |

Anexo U. Comparação entre os valores de vasos sanguíneos na interface e vasos sanguíneos portais

| | | Vasos sanguíneos na interface | | | p<0,01 |
|--------------------------|----------------|-------------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | VSI Baixo Grau | VSI Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos sanguíneos portais | VSP Baixo Grau | 37 | 0 | 37 | |
| | VSP Alto Grau | 10 | 25 | 35 | |
| Total Geral | | 47 | 25 | 72 | |

Ainda que a formação de vasos sanguíneos portais e na interface tenha mostrado um paralelismo, tal processo é mais exuberante nos espaços porta, de modo que em 10 casos houve predomínio de formação de vasos sanguíneos portais.

Anexo V. Comparação entre os valores de vasos sanguíneos no parênquima e vasos sanguíneos portais

| | | Vasos sanguíneos no parênquima | | | |
|--------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|-------------|--------|
| | | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos sanguíneos portais | VSP Baixo Grau | 37 | 0 | 37 | p<0,01 |
| | VSP Alto Grau | 0 | 35 | 35 | |
| Total Geral | | 37 | 35 | 72 | |

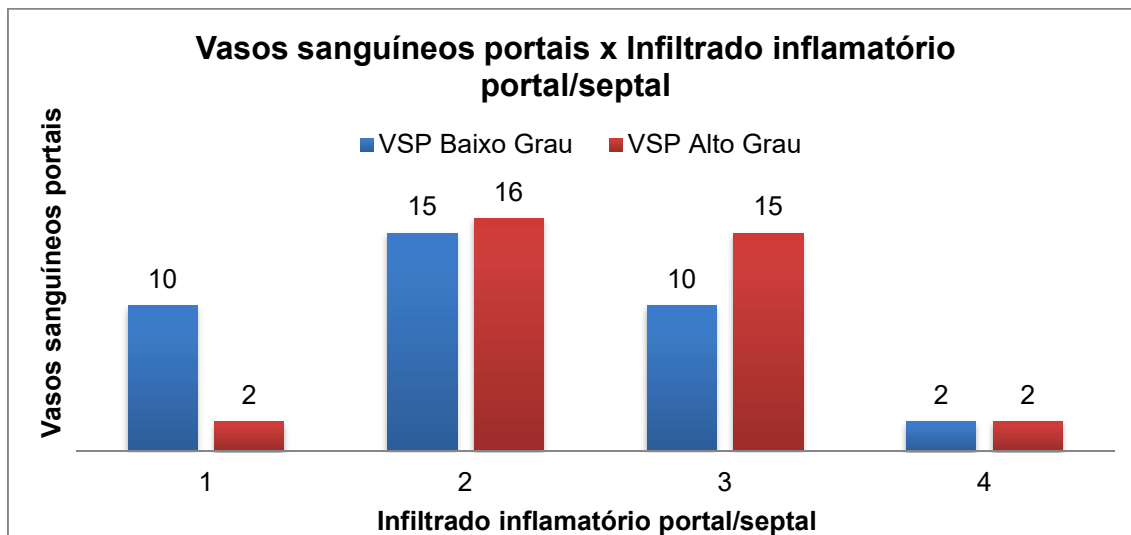
A distribuição entre casos com maior ou menor quantidade de vasos sanguíneos portais e sinusoidais foi idêntica.

Anexo W. Comparação entre os valores de vasos sanguíneos no parênquima e vasos sanguíneos na interface

| | | Vasos sanguíneos no parênquima | | | |
|-------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|-------------|--------|
| | | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral | |
| Vasos sanguíneos na interface | VSI Baixo Grau | 37 | 10 | 47 | p<0,01 |
| | VSI Alto Grau | 0 | 25 | 25 | |
| Total Geral | | 37 | 35 | 72 | |

Ainda que a formação de vasos sanguíneos sinusoidais e na interface tenha mostrado um paralelismo, em 10 casos houve predomínio de formação de vasos sanguíneos sinusoidais.

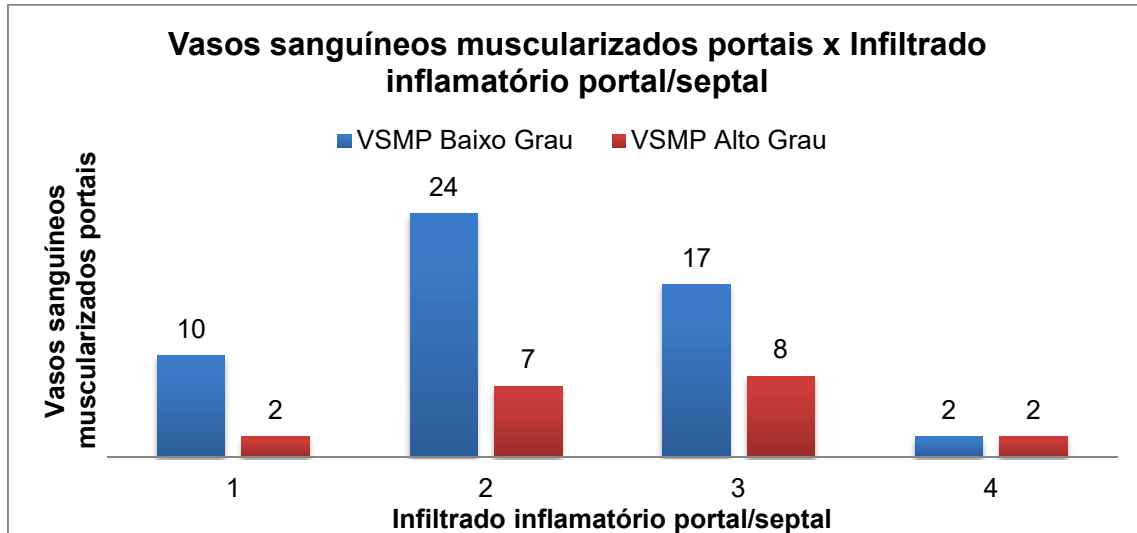
Anexo X. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal



Anexo Y. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio

| | | Vasos sanguíneos portais | | | p=0,16 |
|---------------------------------------|-------------|--------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | VSP Baixo Grau | VSP Alto Grau | Total Geral | |
| Infiltrado inflamatório portal/septal | 0-1-2 | 25 | 18 | 43 | |
| | 3-4 | 12 | 17 | 29 | |
| | Total Geral | 37 | 35 | 72 | |

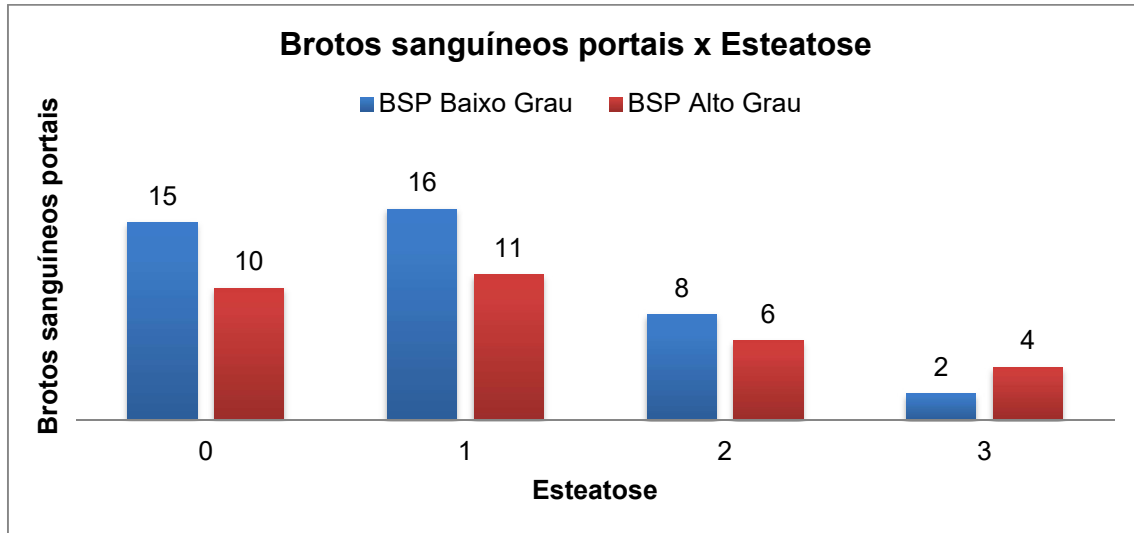
Anexo Z. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de infiltrado inflamatório portal/septal



Anexo AA. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio

| | | Vasos sanguíneos muscularizados portais | | | p=0,20 |
|---------------------------------------|-------|---|----------------|-------------|--------|
| | | VSMP Baixo Grau | VSMP Alto Grau | Total Geral | |
| Infiltrado inflamatório portal/septal | 0-1-2 | 34 | 9 | 43 | |
| | 3-4 | 19 | 10 | 29 | |
| Total Geral | | 53 | 19 | 72 | |

Anexo BB. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme esteatose

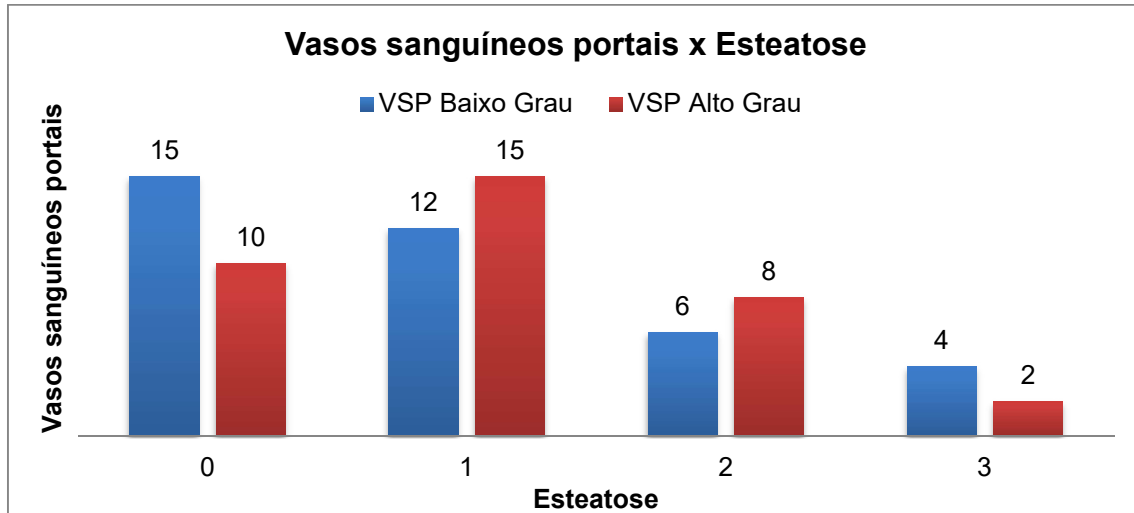


Anexo CC. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio

| Esteatose | Brotos sanguíneos portais | | |
|-------------|---------------------------|---------------|-------------|
| | BSP Baixo Grau | BSP Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 31 | 21 | 52 |
| 2-3 | 10 | 10 | 20 |
| Total Geral | 41 | 31 | 72 |

p=0,46

Anexo DD. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme esteatose

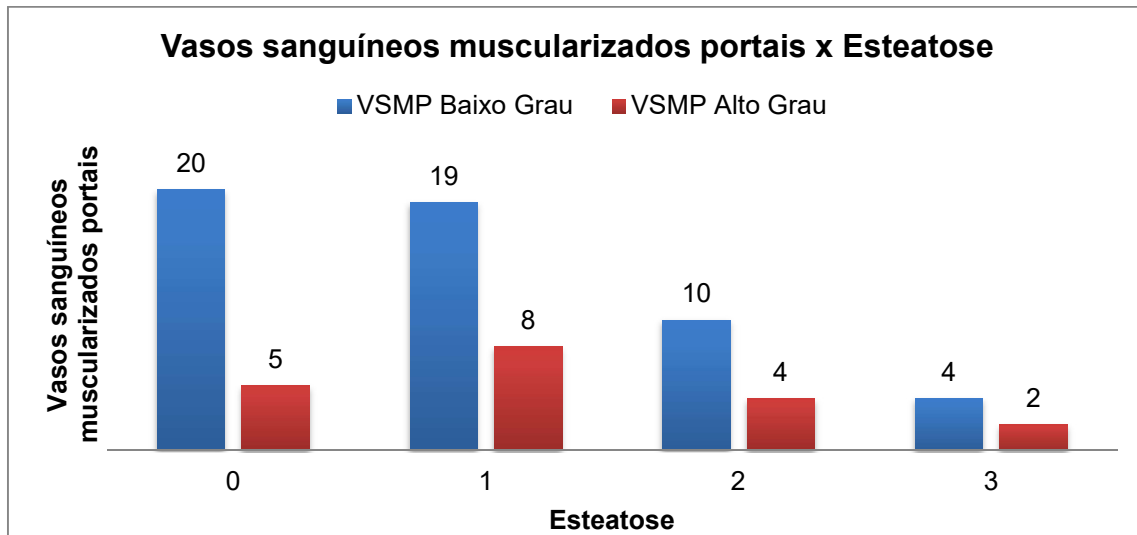


Anexo EE. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio

| | | Vasos sanguíneos portais | | |
|-----------|-------------|--------------------------|---------------|-------------|
| | | VSP Baixo Grau | VSP Alto Grau | Total Geral |
| Esteatose | 0-1 | 27 | 25 | 52 |
| | 2-3 | 10 | 10 | 20 |
| | Total Geral | 37 | 35 | 72 |

$p=0,88$

Anexo FF. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme graus de esteatose

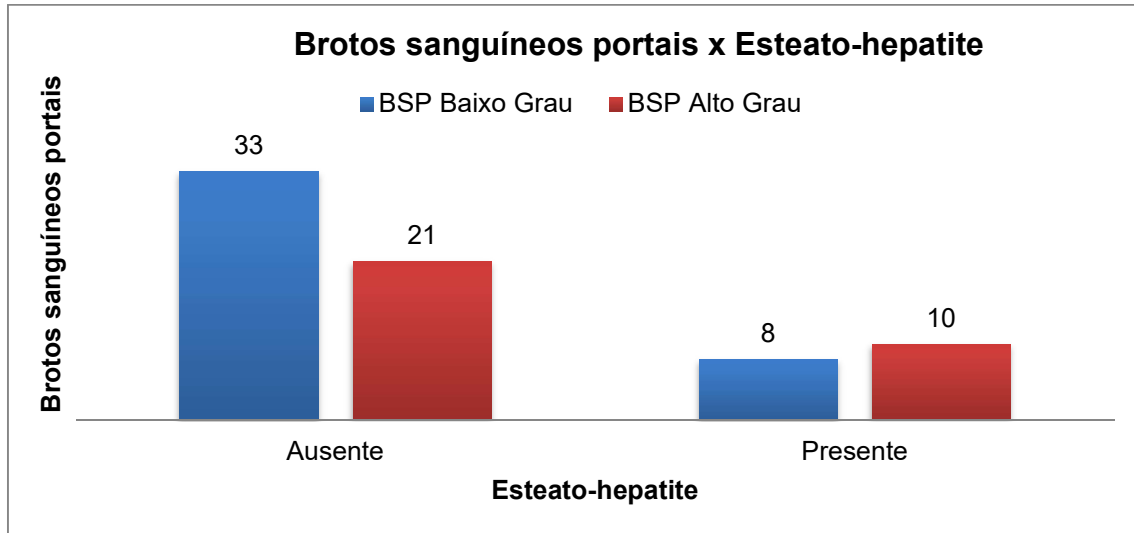


Anexo GG. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio

| | | Vasos sanguíneos muscularizados portais | | |
|-------------|-----|---|----------------|-------------|
| | | VSMP Baixo Grau | VSMP Alto Grau | Total Geral |
| Esteatose | 0-1 | 39 | 13 | 52 |
| | 2-3 | 14 | 6 | 20 |
| Total Geral | | 53 | 19 | 72 |

p=0,66

Anexo HH. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

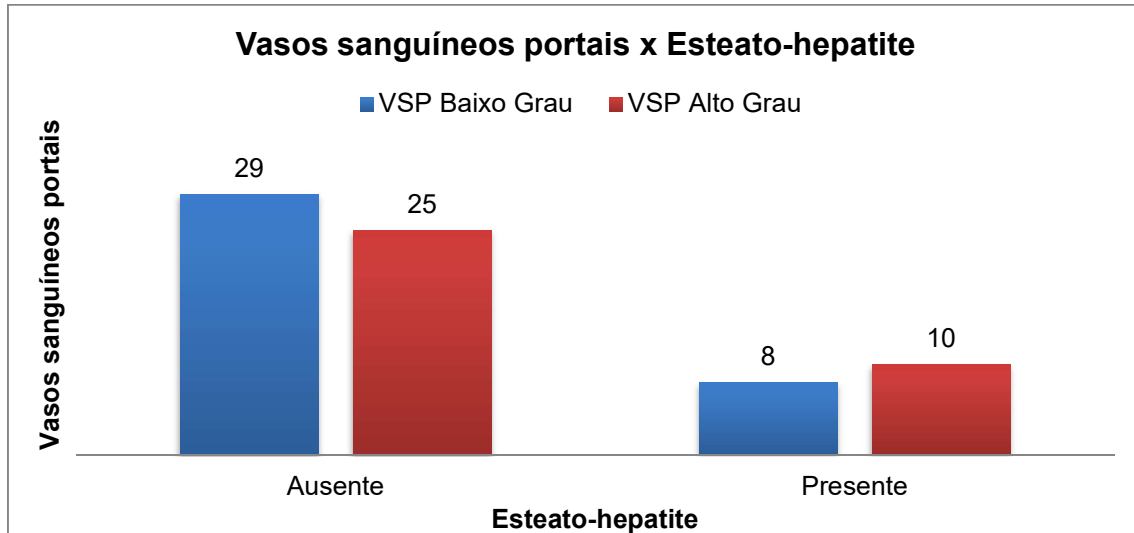


Anexo II. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

| Esteato-hepatite | Brotos sanguíneos portais | | |
|------------------|---------------------------|---------------|-------------|
| | BSP Baixo Grau | BSP Alto Grau | Total Geral |
| Ausente | 33 | 21 | 54 |
| Presente | 8 | 10 | 18 |
| Total Geral | 41 | 31 | 72 |

p=0,21

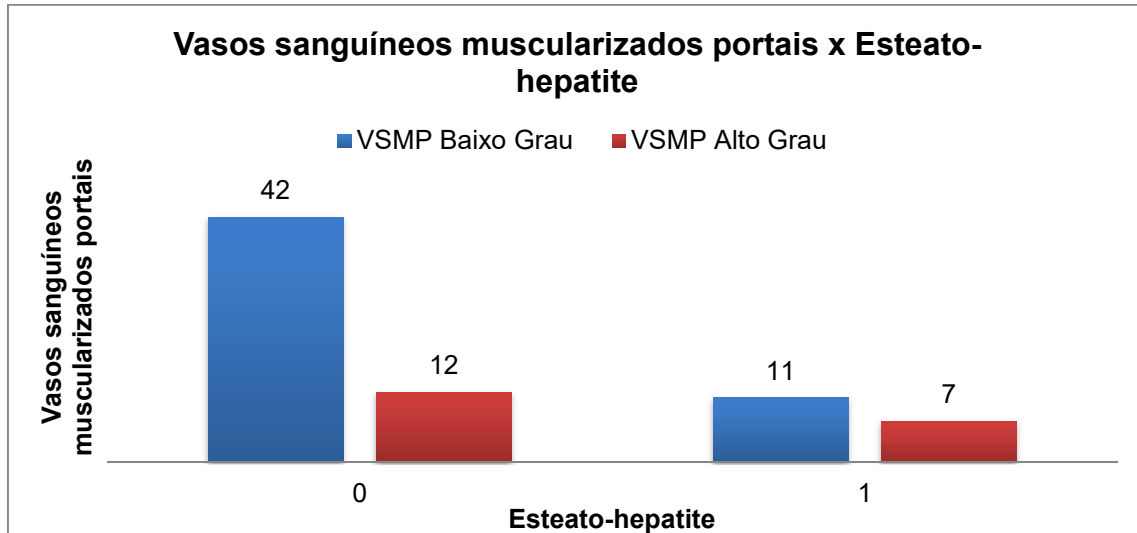
Anexo JJ. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite



Anexo KK. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

| | | Vasos sanguíneos portais | | | |
|------------------|----------|--------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | VSP Baixo Grau | VSP Alto Grau | Total Geral | |
| Esteato-hepatite | Ausente | 29 | 25 | 54 | p=0,49 |
| | Presente | 8 | 10 | 18 | |
| Total Geral | | 37 | 35 | 72 | |

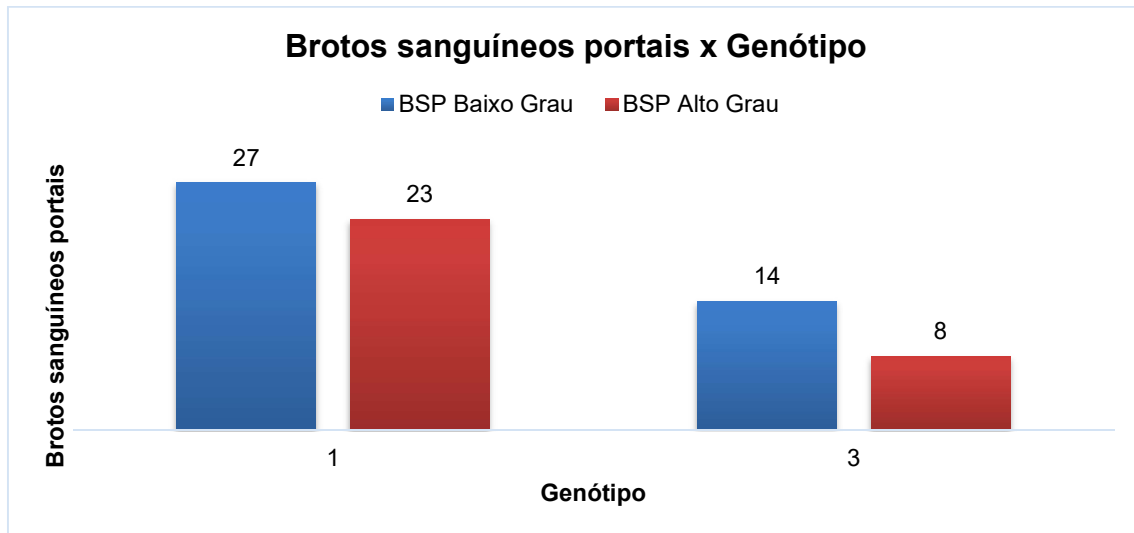
Anexo LL. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme ausência ou presença esteato-hepatite



Anexo MM. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme ausência ou presença esteato-hepatite

| | | Vasos sanguíneos muscularizados portais | | | p=0,16 |
|------------------|----------|---|----------------|-------------|--------|
| | | VSMP Baixo Grau | VSMP Alto Grau | Total Geral | |
| Esteato-hepatite | Ausente | 42 | 12 | 54 | |
| | Presente | 11 | 7 | 18 | |
| Total Geral | | 53 | 19 | 72 | |

Anexo NN. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme genótipo

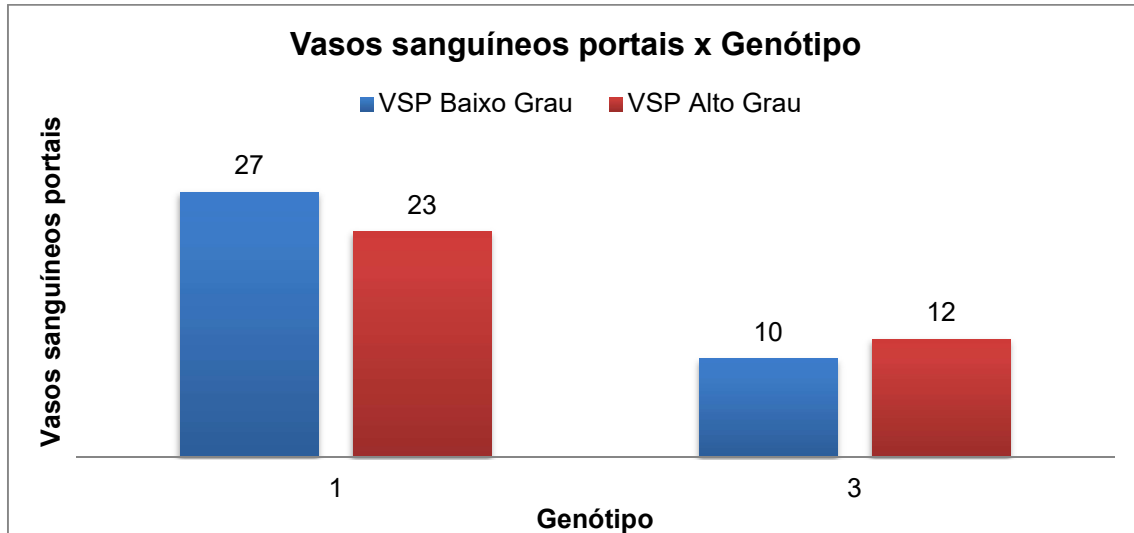


Anexo OO. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme genótipo

| Genótipo | Brotos sanguíneos portais | | |
|-------------|---------------------------|---------------|-------------|
| | BSP Baixo Grau | BSP Alto Grau | Total Geral |
| 1 | 27 | 23 | 50 |
| 3 | 14 | 8 | 22 |
| Total Geral | 41 | 31 | 72 |

p=0,44

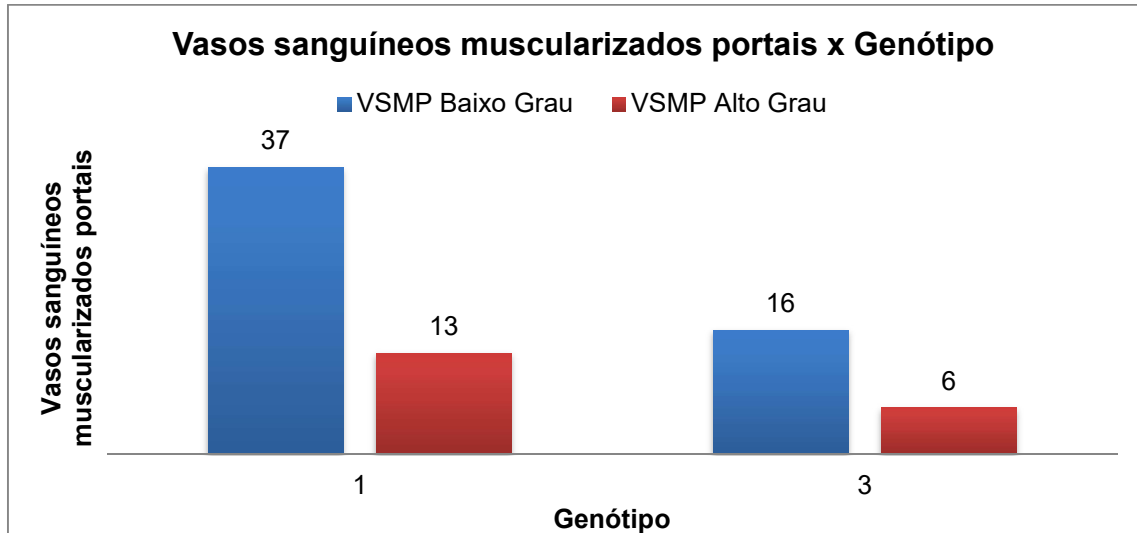
Anexo PP. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme genótipo



Anexo QQ. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos portais marcados pelo endotélio conforme genótipo

| | | Vasos sanguíneos portais | | | p=0,50 |
|-------------|---|--------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | VSP Baixo Grau | VSP Alto Grau | Total Geral | |
| Genótipo | 1 | 27 | 23 | 50 | |
| | 3 | 10 | 12 | 22 | |
| Total Geral | | 37 | 35 | 72 | |

Anexo RR. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme genótipo

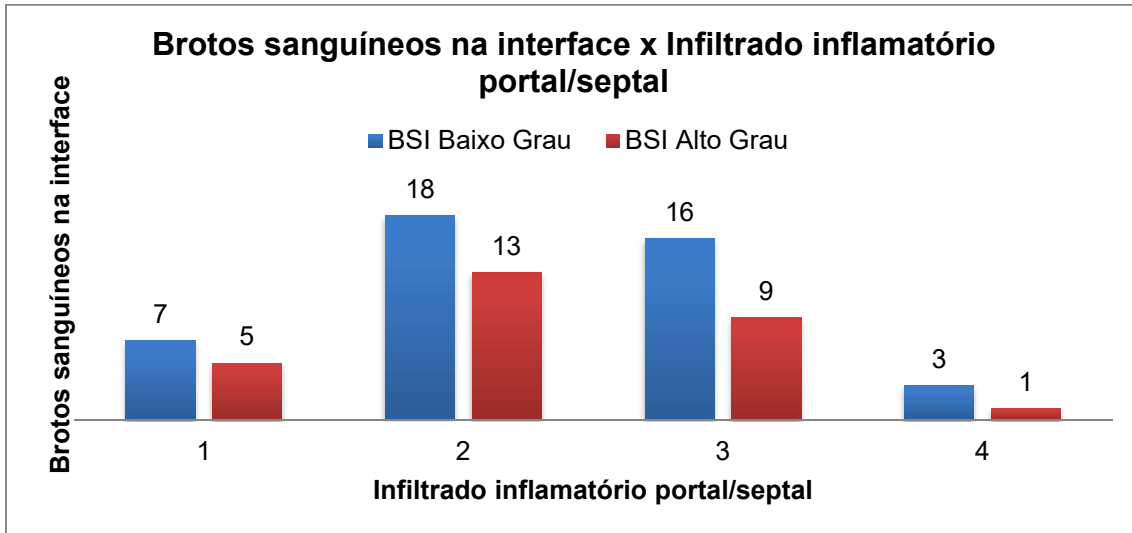


Anexo SS. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos muscularizados portais marcados pelo endotélio conforme genótipo

| | | Vasos sanguíneos muscularizados portais | | |
|-------------|---|---|----------------|-------------|
| | | VSMP Baixo Grau | VSMP Alto Grau | Total Geral |
| Genótipo | 1 | 37 | 13 | 50 |
| | 3 | 16 | 6 | 22 |
| Total Geral | | 53 | 19 | 72 |

p=0,91

Anexo TT. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal

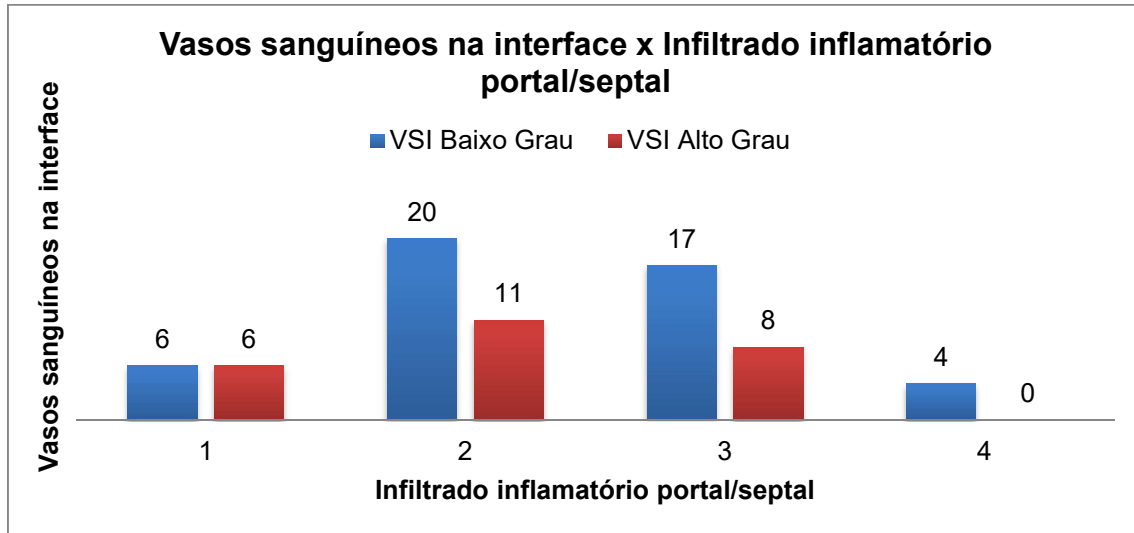


Anexo UU. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Infiltrado inflamatório portal/septal | Brotos sanguíneos na interface | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| 0-1-2 | 25 | 18 | 43 |
| 3-4 | 19 | 10 | 29 |
| Total Geral | 44 | 28 | 72 |

p=0,52

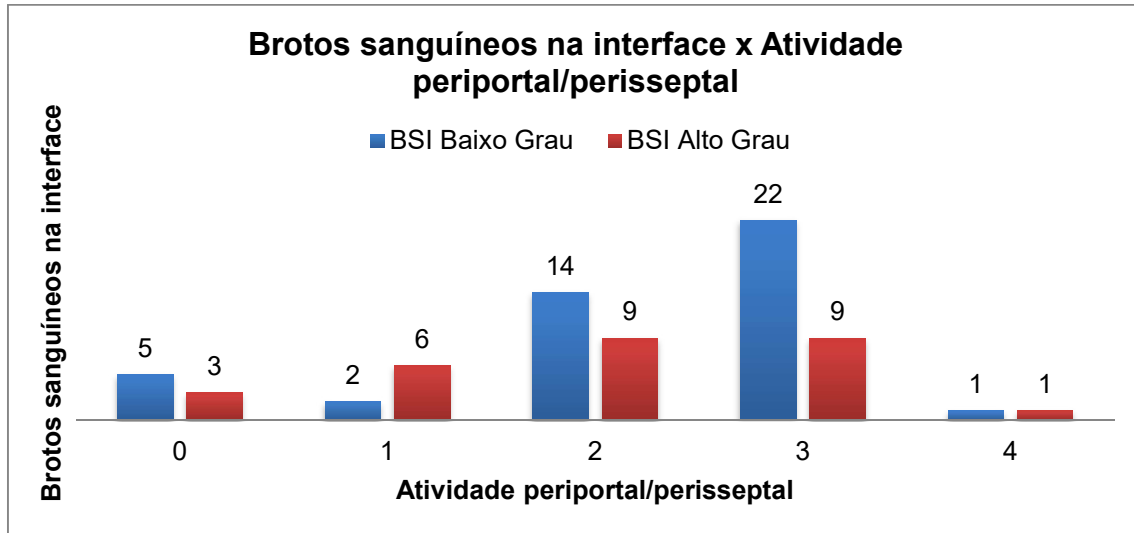
Anexo VV. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal



Anexo WW. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Infiltrado inflamatório portal/septal | Vasos sanguíneos na interface | | | p=0,26 |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|--------|
| | VSI Baixo Grau | VSI Alto Grau | Total Geral | |
| 0-1-2 | 26 | 17 | 43 | |
| 3-4 | 21 | 8 | 29 | |
| Total Geral | 47 | 25 | 72 | |

Anexo XX. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal

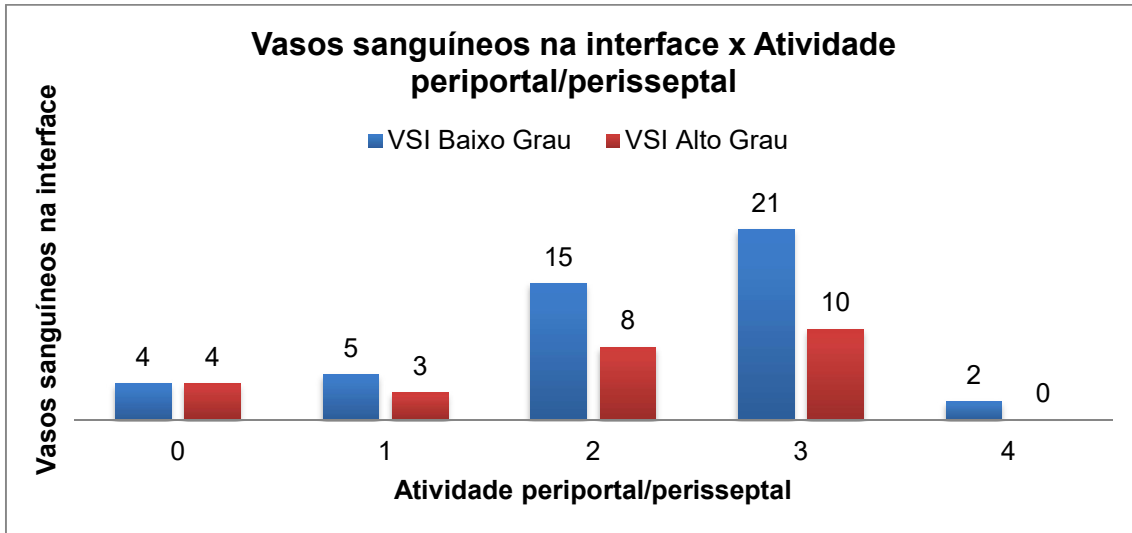


Anexo YY. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade periportal/perisseptal de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Atividade periportal/perisseptal | Brotos sanguíneos na interface | | |
|----------------------------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| 0-1-2 | 21 | 18 | 39 |
| 3-4 | 23 | 10 | 33 |
| Total Geral | 44 | 28 | 72 |

p=0,16

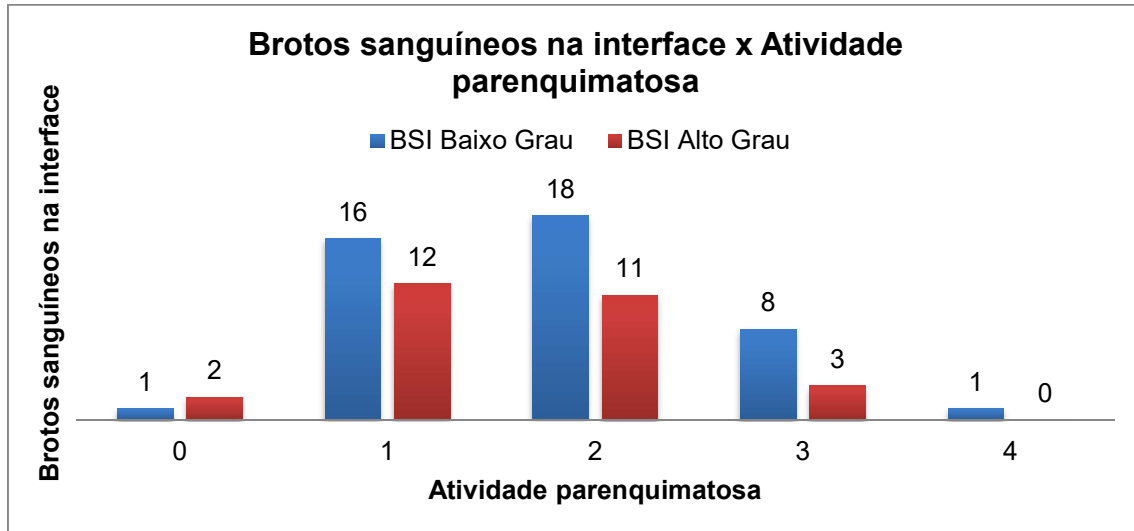
Anexo ZZ. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal



Anexo AAA. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade periportal/perisseptal de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Atividade periportal/perisseptal | Vasos sanguíneos na interface | | | p=0,46 |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|--------|
| | VSI Baixo Grau | VSI Alto Grau | Total Geral | |
| 0-1-2 | 24 | 15 | 39 | |
| 3-4 | 23 | 10 | 33 | |
| Total Geral | 47 | 25 | 72 | |

Anexo BBB. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa

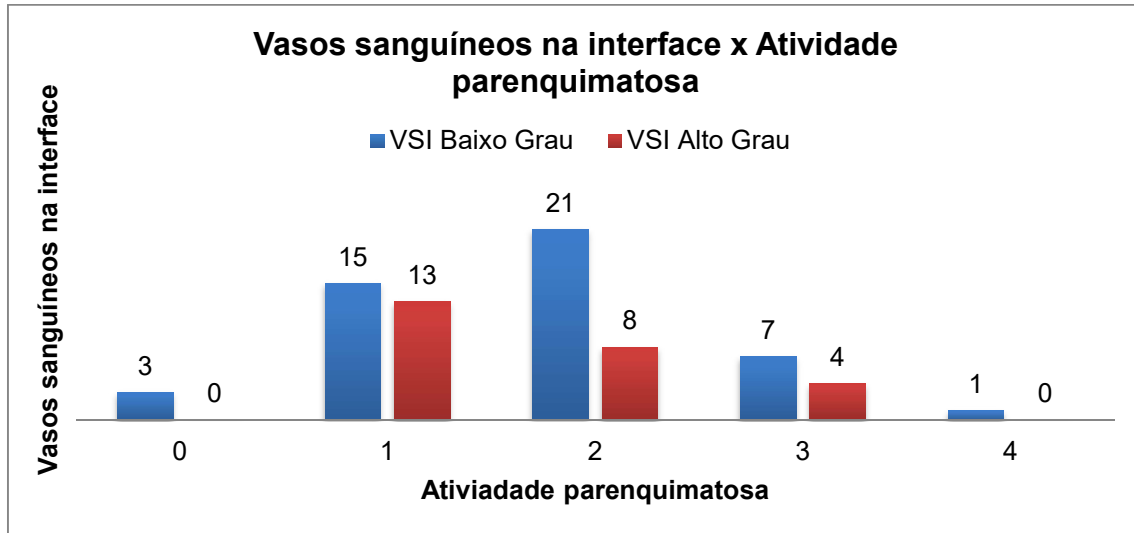


Anexo CCC. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade parenquimatosa de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Atividade parenquimatosa | Brotos sanguíneo na interface | | |
|--------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|
| | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 17 | 14 | 31 |
| 2-3-4 | 27 | 14 | 41 |
| Total Geral | 44 | 28 | 72 |

p=0,34

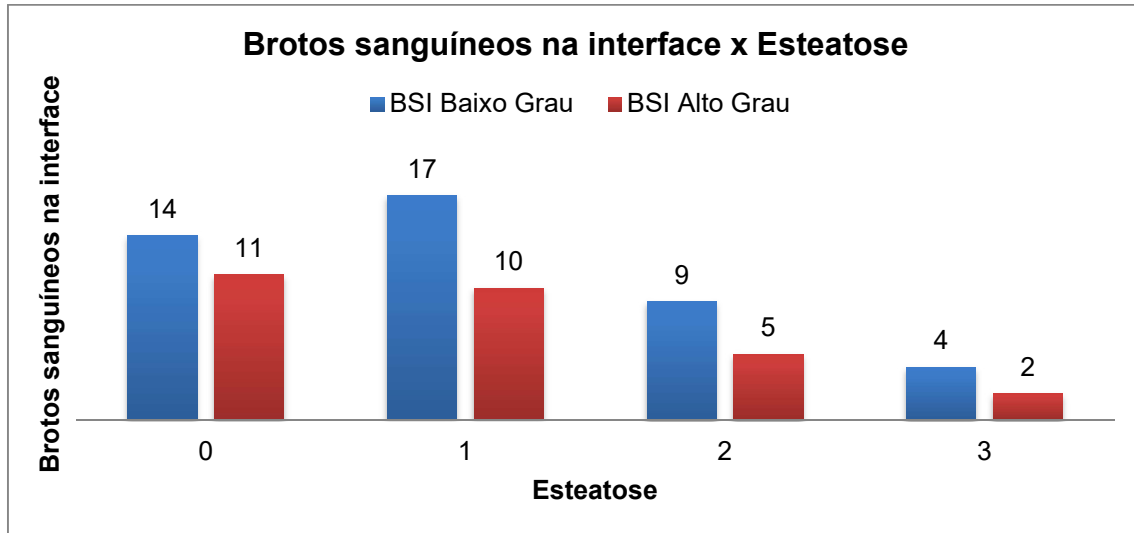
Anexo DDD. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa



Anexo EEE. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade parenquimatosa de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Atividade parenquimatosa | Vasos sanguíneos na interface | | | p=0,26 |
|--------------------------|-------------------------------|---------------|-------------|--------|
| | VSI Baixo Grau | VSI Alto Grau | Total Geral | |
| 0-1 | 18 | 13 | 31 | |
| 2-3-4 | 29 | 12 | 41 | |
| Total Geral | 47 | 25 | 72 | |

Anexo FFF. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme esteatose

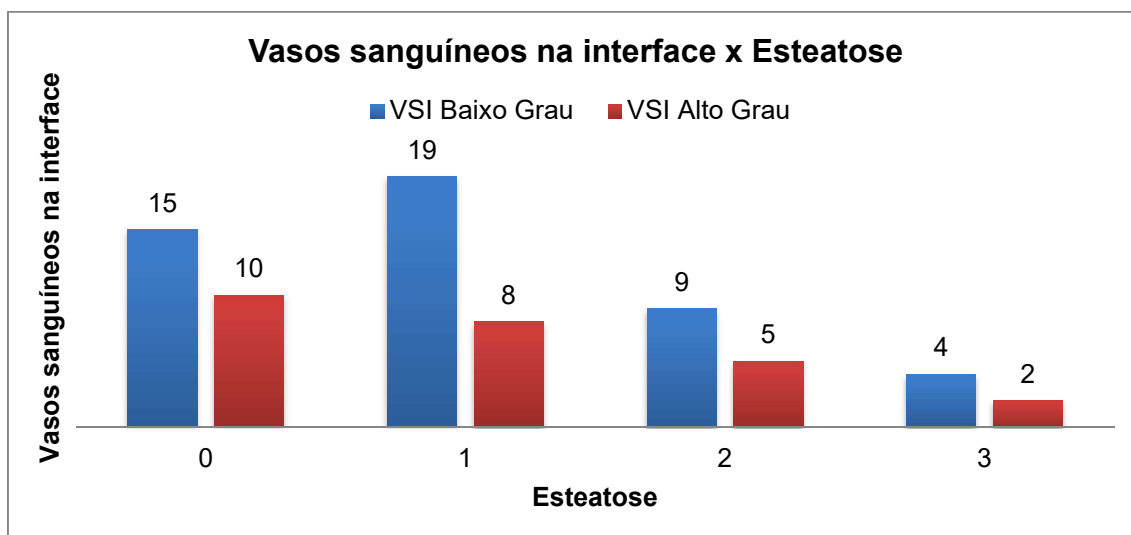


Anexo GGG. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Esteatose | Brotos sanguíneos na interface | | |
|-------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 31 | 21 | 52 |
| 2-3 | 13 | 7 | 20 |
| Total Geral | 44 | 28 | 72 |

p=0,67

Anexo HHH. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme esteatose

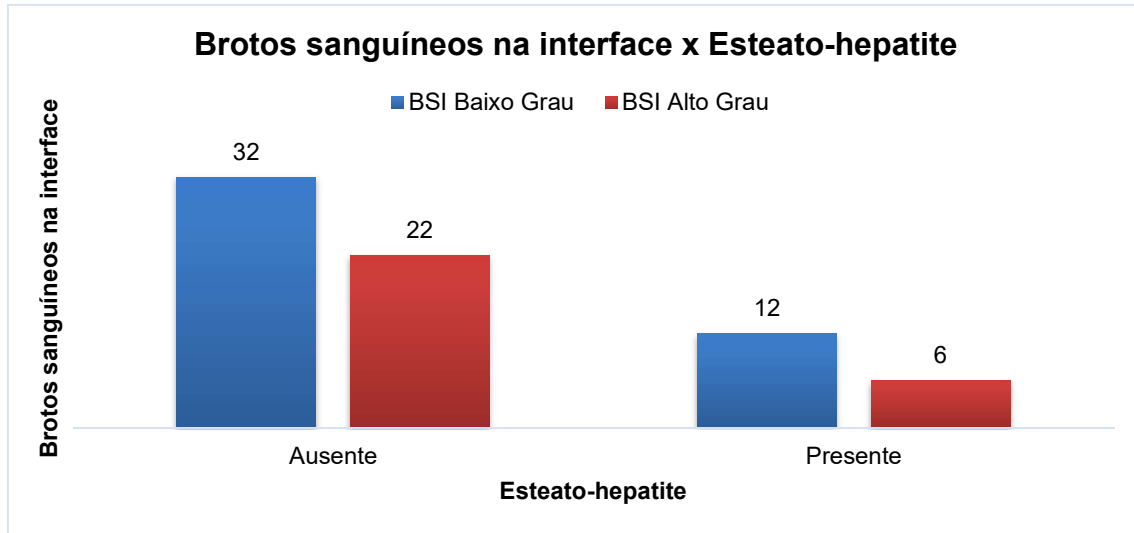


Anexo III. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Esteatose | Vasos sanguíneos na interface | | |
|-------------|-------------------------------|---------------|-------------|
| | VSI Baixo Grau | VSI Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 34 | 18 | 52 |
| 2-3 | 13 | 7 | 20 |
| Total Geral | 47 | 25 | 72 |

p=0,97

Anexo JJJ. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

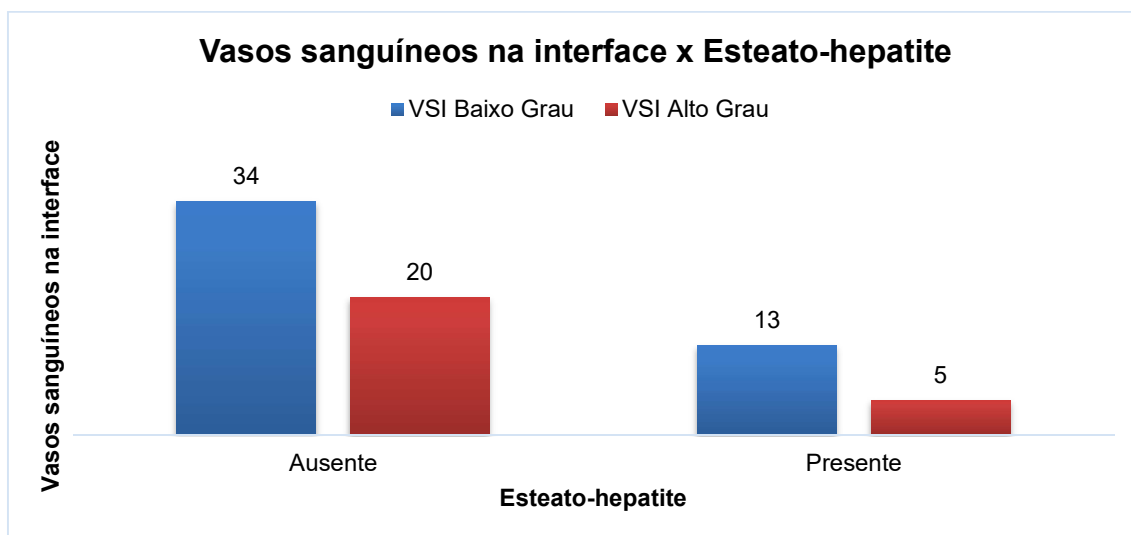


Anexo KKK. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

| Esteato-hepatite | Brotos sanguíneos na interface | | |
|------------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| Ausente | 32 | 22 | 54 |
| Presente | 12 | 6 | 18 |
| Total Geral | 44 | 28 | 72 |

p=0,57

Anexo LLL. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

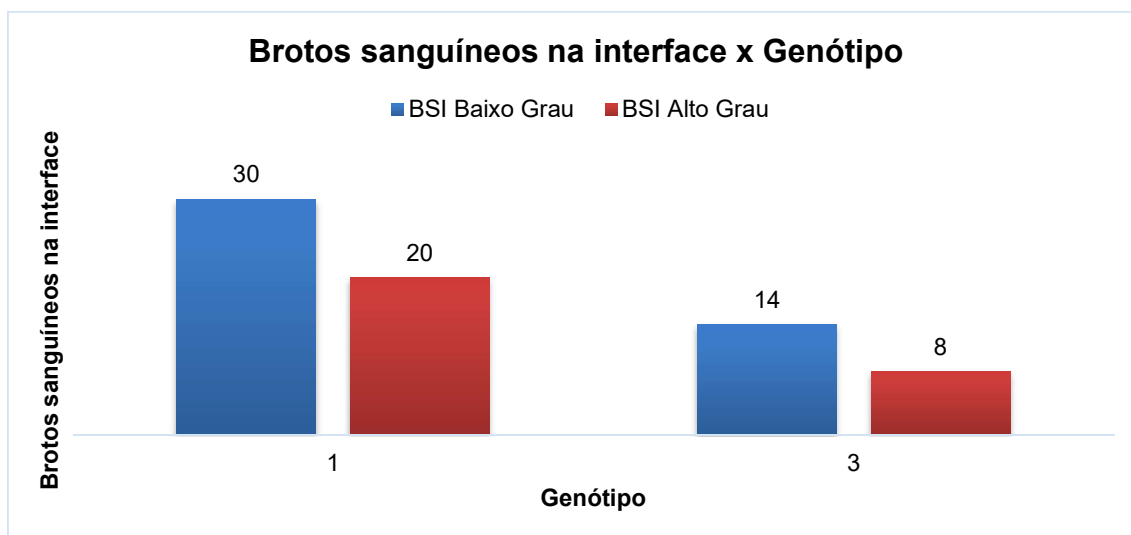


Anexo MMM. Distribuição de casos separados conforme ausência ou presença de esteato-hepatite de vasos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio

| Esteato-hepatite | Vasos sanguíneos na interface | | |
|------------------|-------------------------------|---------------|-------------|
| | VSI Baixo Grau | VSI Alto Grau | Total Geral |
| Ausente | 34 | 20 | 54 |
| Presente | 13 | 5 | 18 |
| Total Geral | 47 | 25 | 72 |

p=0,47

Anexo NNN. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme genótipo

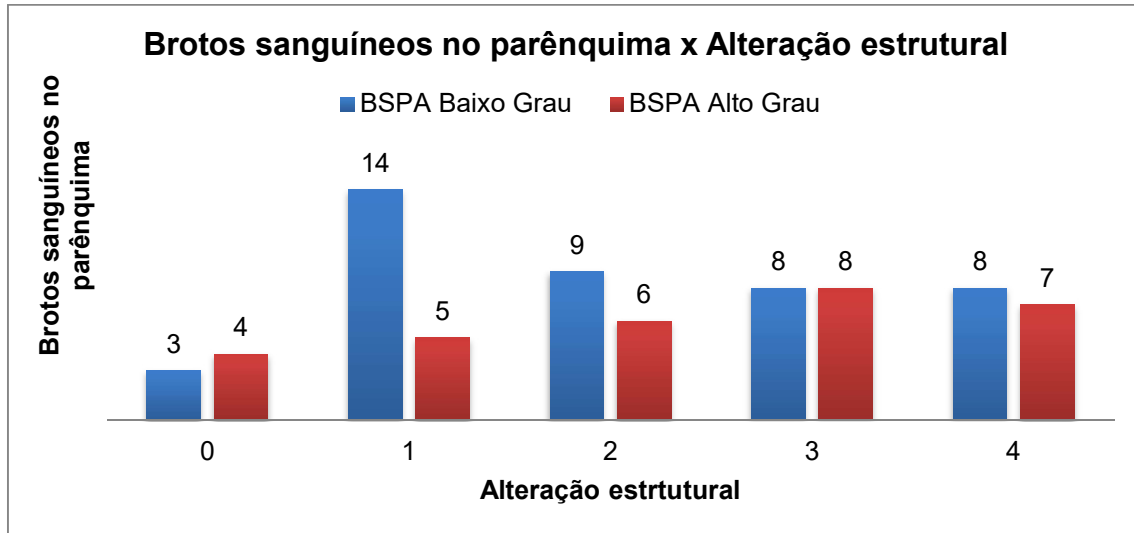


Anexo OOO. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos na interface marcados pelo endotélio conforme genótipo

| Genótipo | Brotos sanguíneos na interface | | |
|-------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | BSI Baixo Grau | BSI Alto Grau | Total Geral |
| 1 | 30 | 20 | 50 |
| 3 | 14 | 8 | 22 |
| Total Geral | 44 | 28 | 72 |

p=0,77

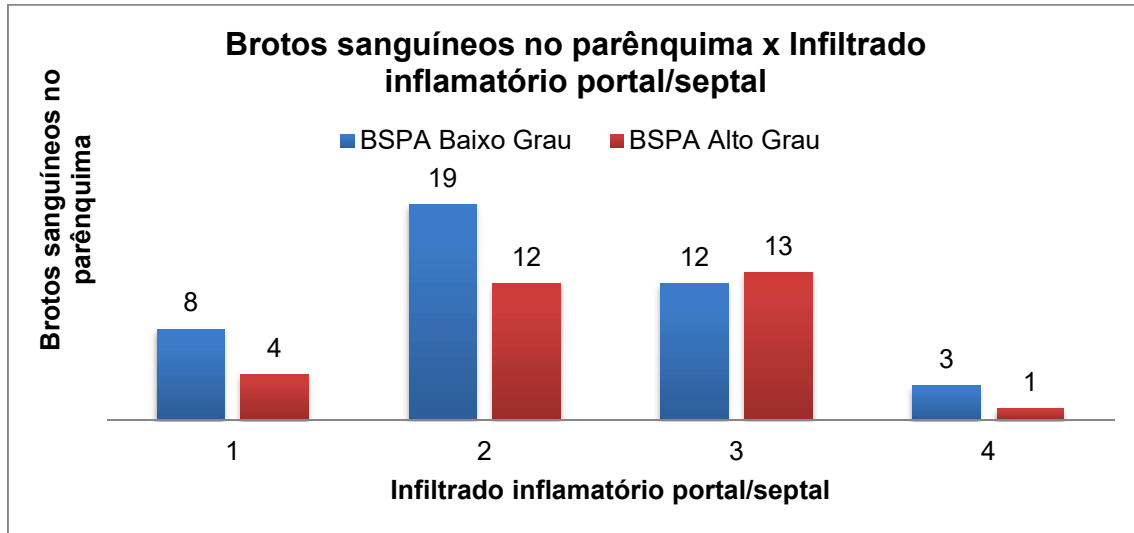
Anexo PPP. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme alterações estruturais



Anexo QQQ. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana das alterações estruturais de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| | | Brotos sanguíneos no parênquima | | | p=0,31 |
|----------------------|-------------|---------------------------------|----------------|-------------|--------|
| | | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | Total Geral | |
| Alteração estrutural | F0-F1-F2 | 26 | 15 | 41 | |
| | F3-F4 | 16 | 15 | 31 | |
| | Total Geral | 42 | 30 | 72 | |

Anexo RRR. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal

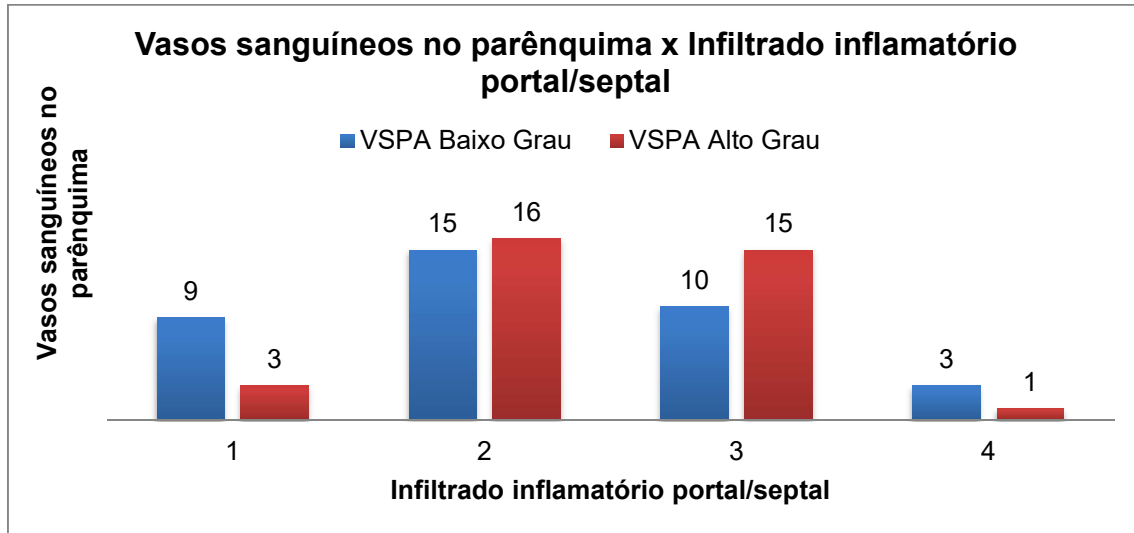


Anexo SSS. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Infiltrado inflamatório portal/septal | Brotos sanguíneos no parênquima | | Total Geral |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | |
| 0-1-2 | 27 | 16 | 43 |
| 3-4 | 15 | 14 | 29 |
| Total Geral | 42 | 30 | 72 |

p=0,35

Anexo TTT. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme infiltrado inflamatório portal/septal

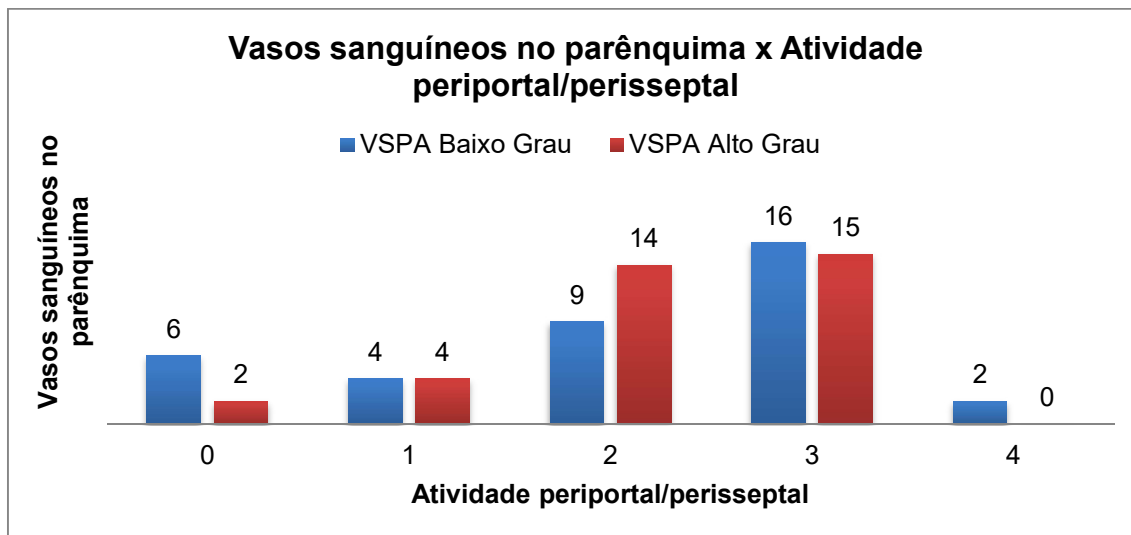


Anexo UUU. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Infiltrado inflamatório portal/septal | Vasos sanguíneos no parênquima | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral |
| 0-1-2 | 24 | 19 | 43 |
| 3-4 | 13 | 16 | 29 |
| Total Geral | 37 | 35 | 72 |

p=0,36

Anexo VVV. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme atividade periportal/perisseptal

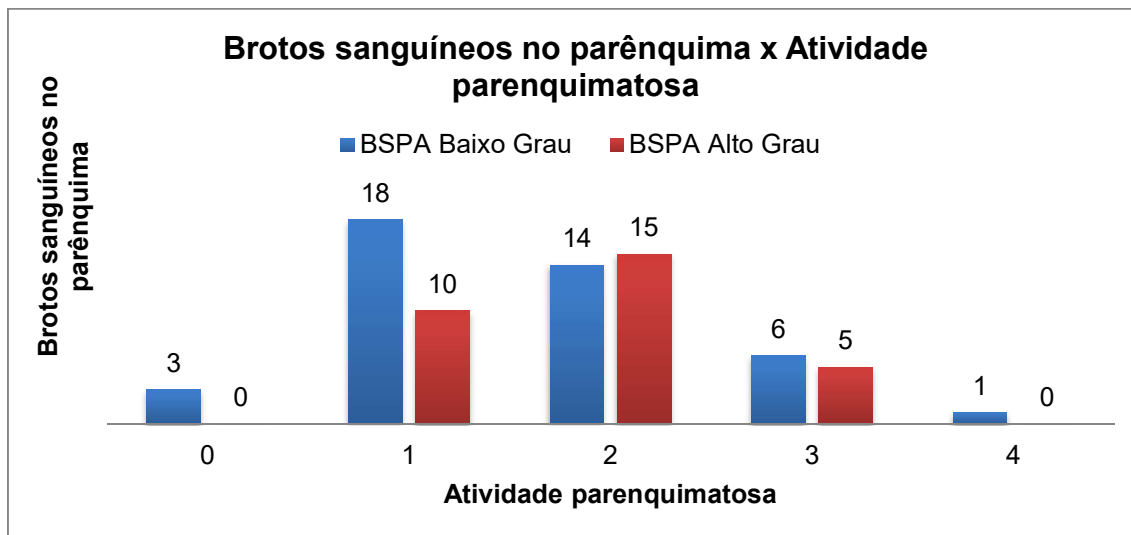


Anexo WWW. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade periportal/perisseptal de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Atividade periportal/perisseptal | Vasos sanguíneos no parênquima | | |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral |
| 0-1-2 | 19 | 20 | 39 |
| 3-4 | 18 | 15 | 33 |
| Total Geral | 37 | 35 | 72 |

$p=0,62$

Anexo XXX. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa

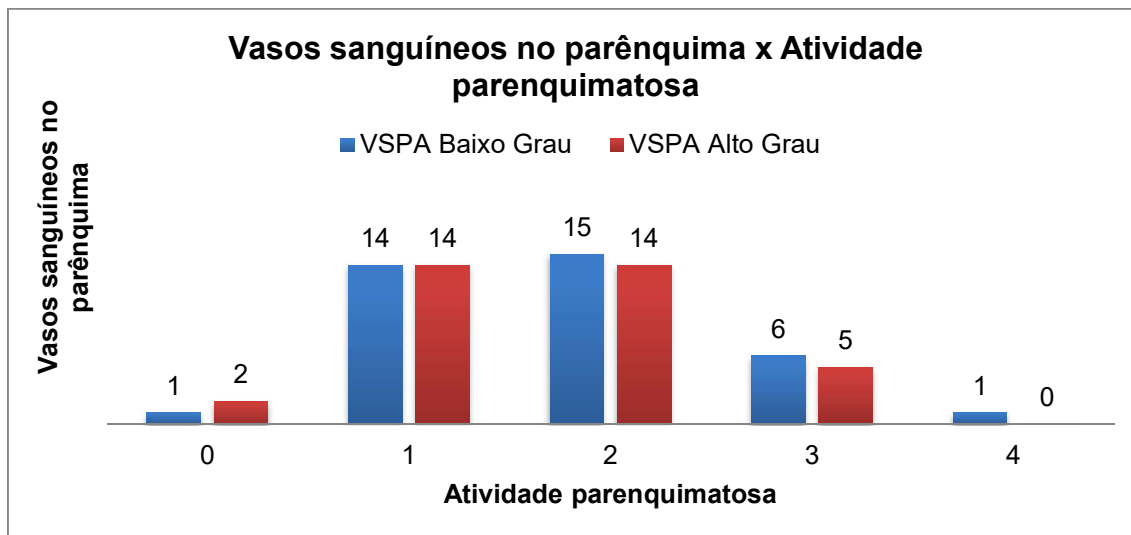


Anexo YYY. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade parenquimatosa de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Atividade parenquimatosa | Brotos sanguíneos no parênquima | | |
|--------------------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 21 | 10 | 31 |
| 2-3-4 | 21 | 20 | 41 |
| Total Geral | 42 | 30 | 72 |

p=0,15

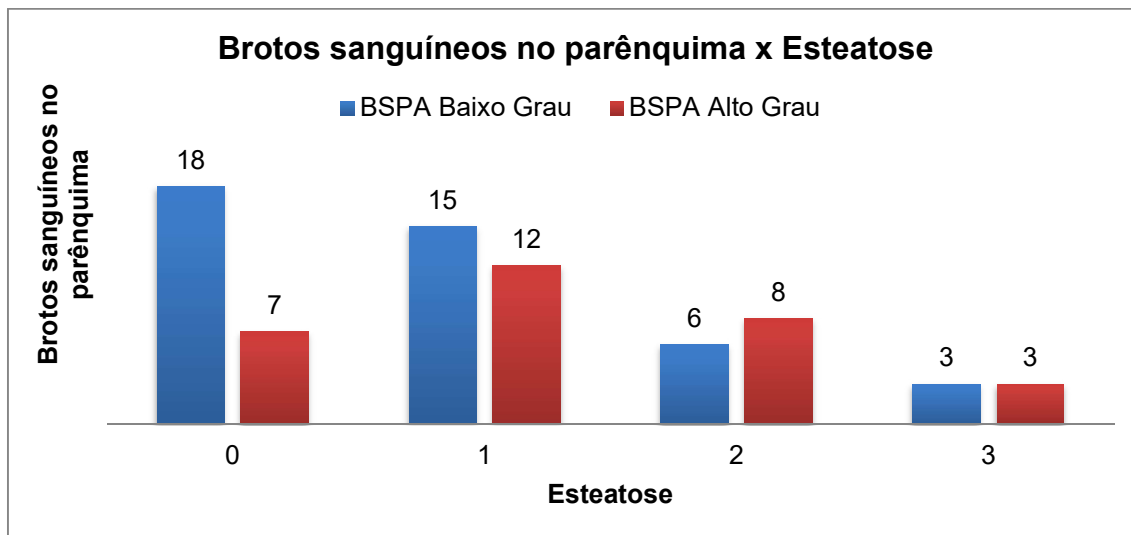
Anexo ZZZ. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme atividade parenquimatosa



Anexo AAAA. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade parenquimatosa de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Atividade parenquimatosa | Vasos sanguíneos no parênquima | | | p=0,65 |
|--------------------------|--------------------------------|----------------|-------------|--------|
| | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral | |
| 0-1 | 15 | 16 | 31 | |
| 2-3-4 | 22 | 19 | 41 | |
| Total Geral | 37 | 35 | 72 | |

Anexo BBBB. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme esteatose

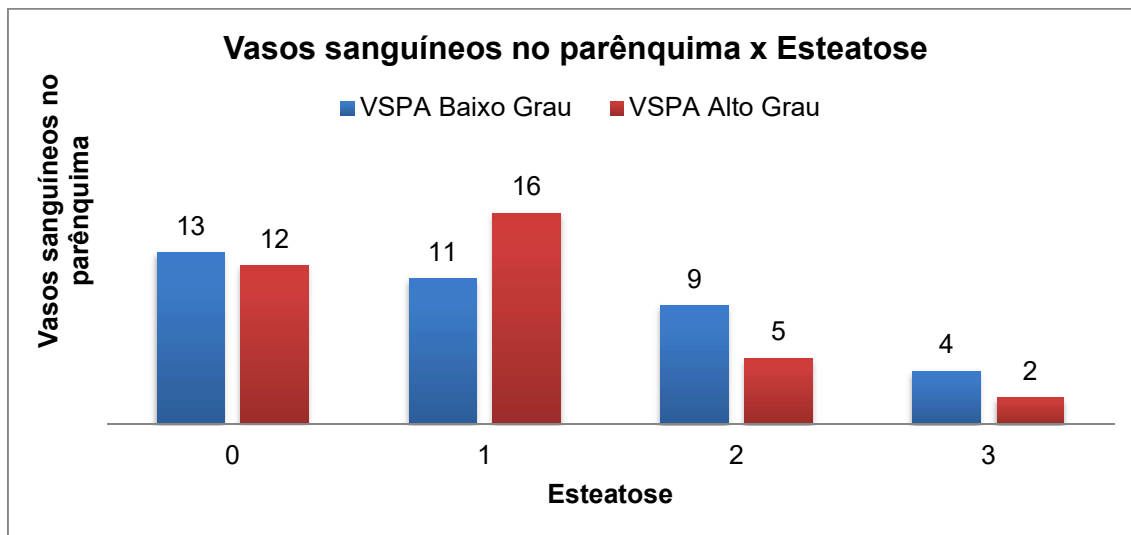


Anexo CCCC. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Esteatose | Brotos sanguíneos no parênquima | | |
|-------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 33 | 19 | 52 |
| 2-3 | 9 | 11 | 20 |
| Total Geral | 42 | 30 | 72 |

p=0,15

Anexo DDDD. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme esteatose

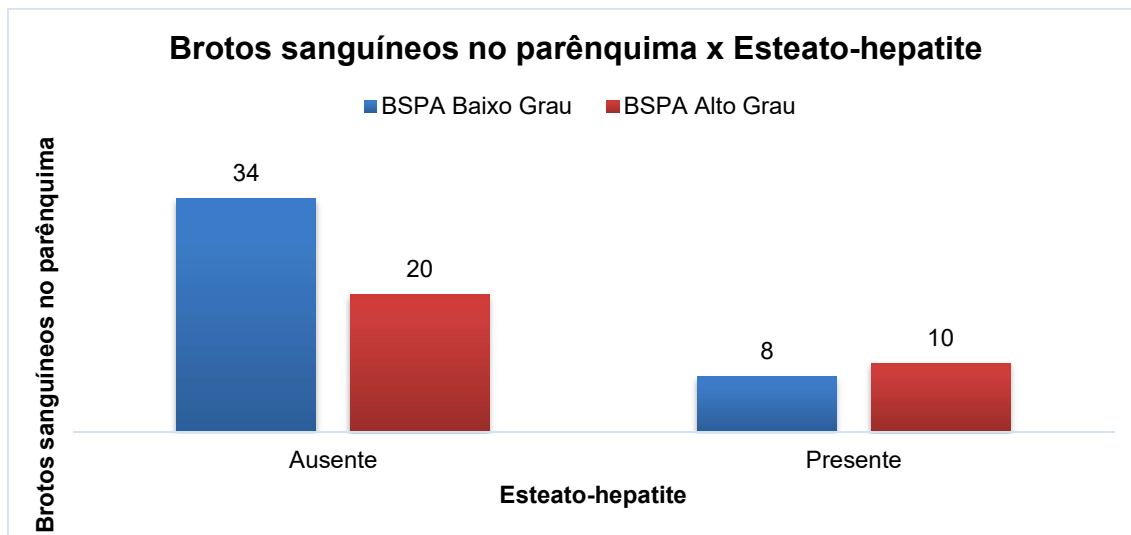


Anexo EEEE. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio

| Esteatose | Vasos sanguíneos no parênquima | | |
|-------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral |
| 0-1 | 24 | 28 | 52 |
| 2-3 | 13 | 7 | 20 |
| Total Geral | 37 | 35 | 72 |

$p=0,15$

Anexo FFFF. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

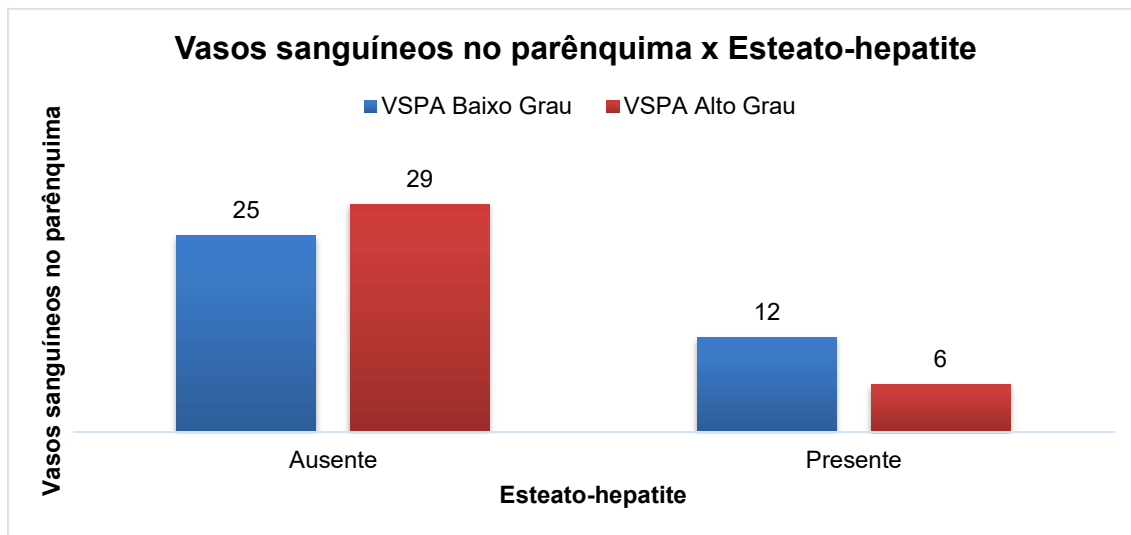


Anexo GGGG. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

| Esteato-hepatite | Brotos sanguíneos no parênquima | | |
|------------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | Total Geral |
| Ausente | 34 | 20 | 54 |
| Presente | 8 | 10 | 18 |
| Total Geral | 42 | 30 | 72 |

p=0,16

Anexo HHHH. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

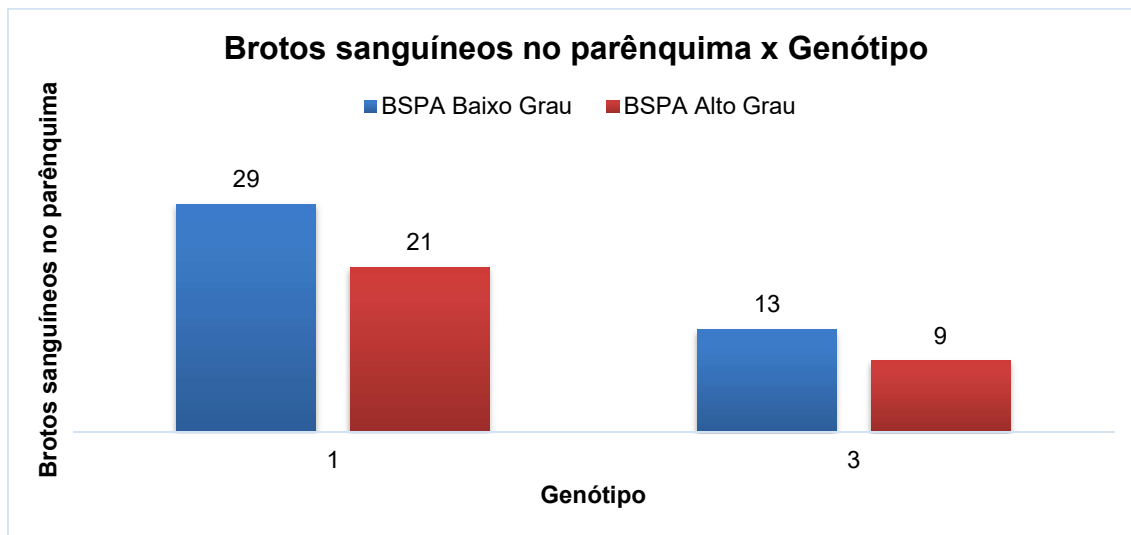


Anexo IIII. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme esteato-hepatite

| Esteato-hepatite | Vasos sanguíneos no parênquima | | |
|------------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral |
| Ausente | 25 | 29 | 54 |
| Presente | 12 | 6 | 18 |
| Total Geral | 37 | 35 | 72 |

p=0,13

Anexo JJJJ. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme genótipo

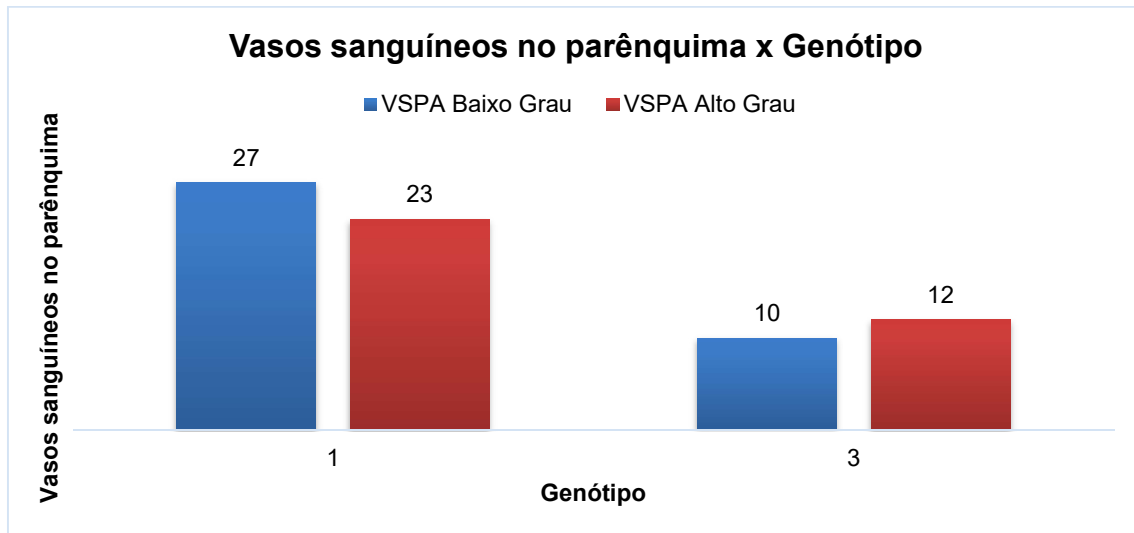


Anexo KKKK. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme genótipo

| Genótipo | Brotos sanguíneos no parênquima | | |
|-------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| | BSPA Baixo Grau | BSPA Alto Grau | Total Geral |
| 1 | 29 | 21 | 50 |
| 3 | 13 | 9 | 22 |
| Total Geral | 42 | 30 | 72 |

p=0,93

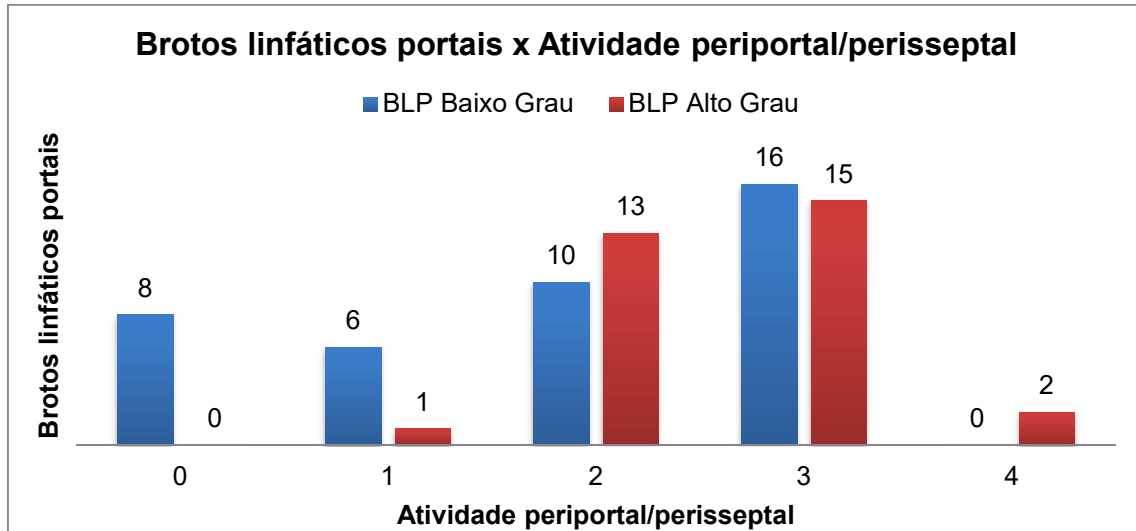
Anexo LLLL. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme genótipo



Anexo MMMM. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos sanguíneos no parênquima marcados pelo endotélio conforme genótipo

| Genótipo | Vasos sanguíneos no parênquima | | | p=0,50 |
|--------------------|--------------------------------|----------------|-------------|--------|
| | VSPA Baixo Grau | VSPA Alto Grau | Total Geral | |
| 1 | 27 | 23 | 50 | |
| 3 | 10 | 12 | 22 | |
| Total Geral | 37 | 35 | 72 | |

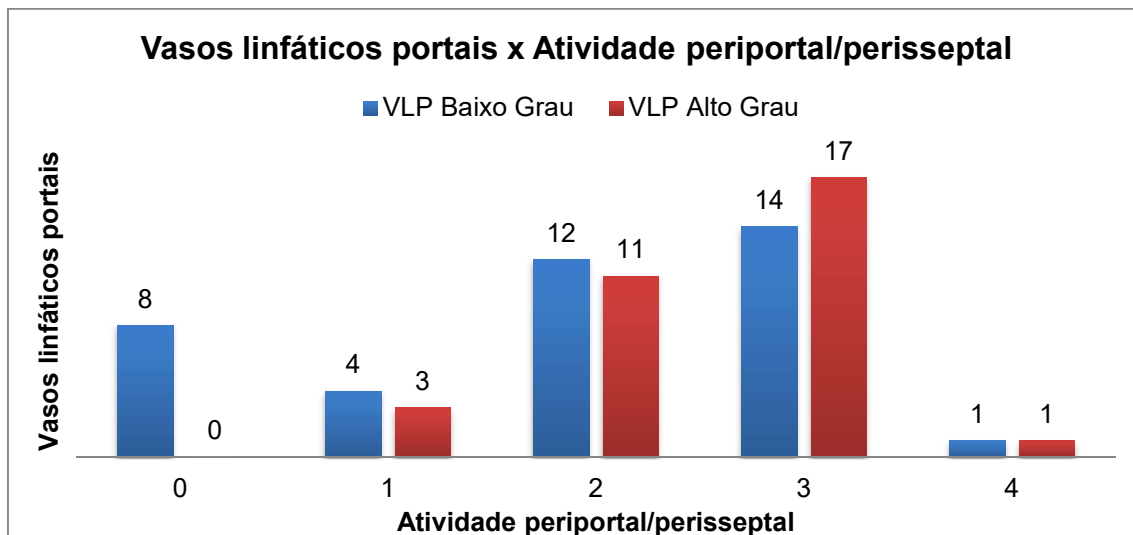
Anexo NNNN. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de atividade periportal/perisseptal



Anexo OOOO. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade periportal/perisseptal de brotos linfáticos portais marcados pelo endotélio linfático

| | | Brotos linfáticos portais | | | p=0,21 |
|----------------------------------|-------------|---------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | BLP Baixo Grau | BLP Alto Grau | Total Geral | |
| Atividade periportal/perisseptal | 0-1-2 | 24 | 14 | 38 | |
| | 3-4 | 16 | 17 | 33 | |
| | Total Geral | 40 | 31 | 71 | |

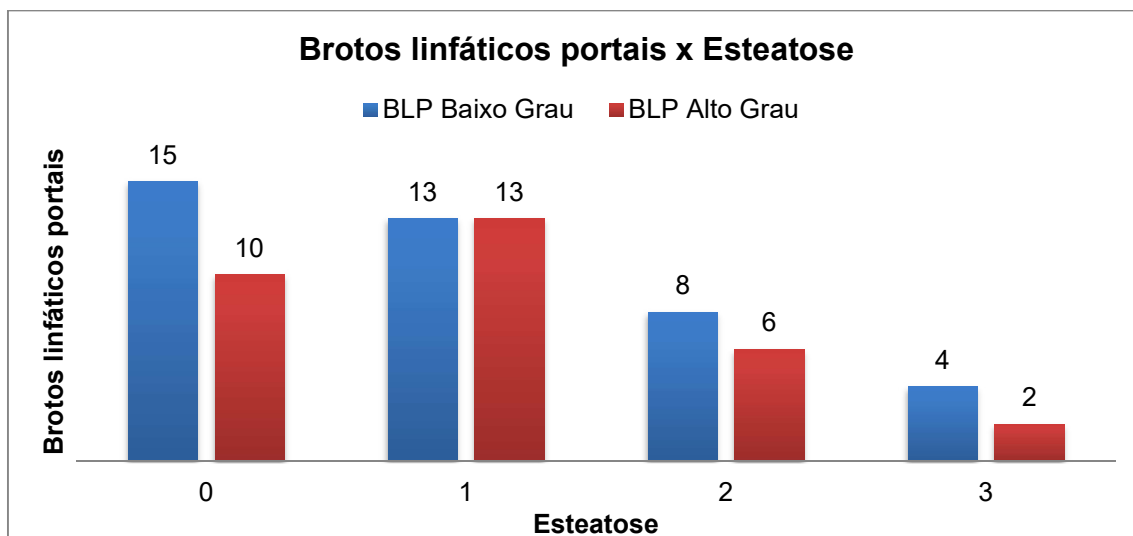
Anexo PPPP. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de atividade periportal/perisseptal



Anexo QQQQ. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da atividade periportal/perisseptal de vasos linfáticos portais marcados pelo endotélio linfático

| | | Vasos linfáticos portais | | | p=0,13 |
|---------------------------------|-------|--------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | VLP Baixo Grau | VLP Alto Grau | Total Geral | |
| Atividade periporta/perisseptal | 0-1-2 | 24 | 14 | 38 | |
| | 3-4 | 15 | 18 | 33 | |
| Total Geral | | 39 | 32 | 71 | |

Anexo RRRR. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme os graus de esteatose

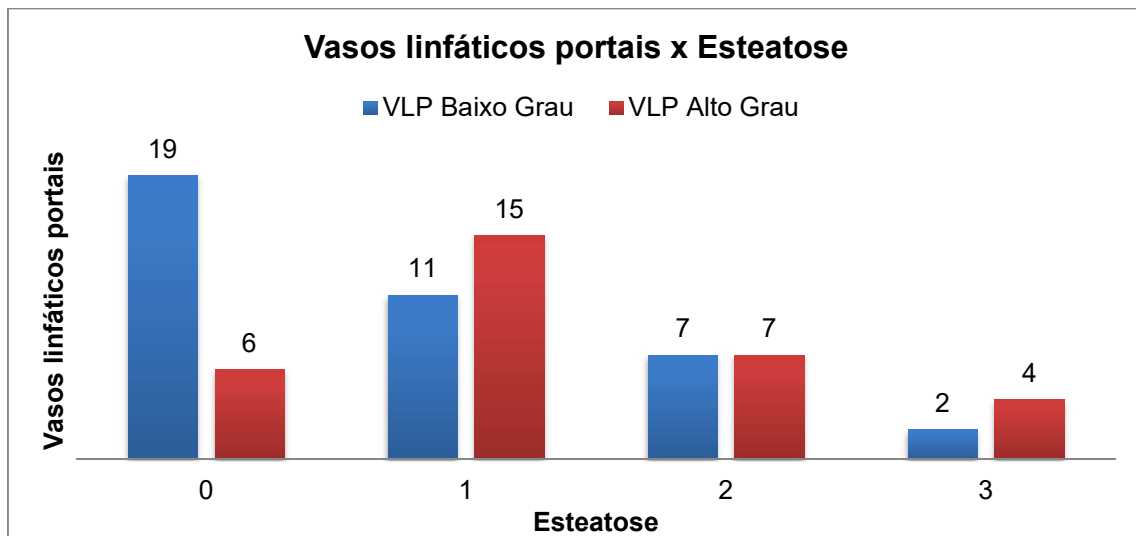


Anexo SSSS. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de brotos linfáticos portais marcados pelo endotélio linfático

| | | Brotos linfáticos portais | | |
|-------------|-----|---------------------------|---------------|-------------|
| | | BLP Baixo Grau | BLP Alto Grau | Total Geral |
| Esteatose | | | | |
| Esteatose | 0-1 | 28 | 23 | 51 |
| | 2-3 | 12 | 8 | 20 |
| Total Geral | | 40 | 31 | 71 |

$p=0,69$

Anexo TTTT. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme os graus de esteatose

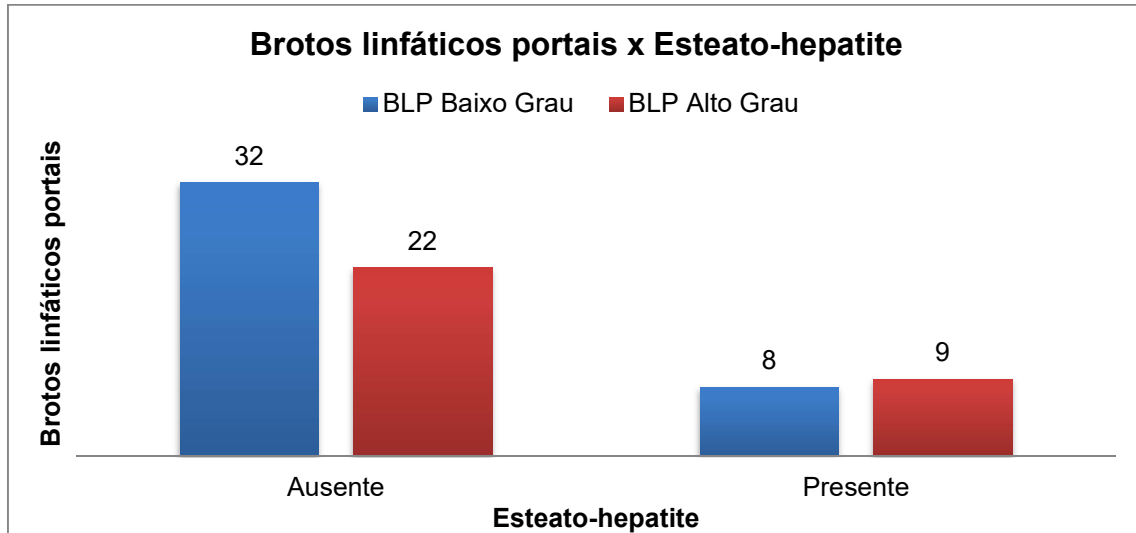


Anexo UUUU. Distribuição de casos separados de acordo com a mediana da esteatose de vasos linfáticos portais marcados pelo endotélio linfático

| | | Vasos linfáticos portais | | |
|-------------|-----|--------------------------|---------------|-------------|
| | | VLP Baixo Grau | VLP Alto Grau | Total Geral |
| Esteatose | | | | |
| Esteatose | 0-1 | 30 | 21 | 51 |
| | 2-3 | 9 | 11 | 20 |
| Total Geral | | 39 | 32 | 71 |

$p=0,29$

Anexo VVVV. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme ausência ou presença esteato-hepatite

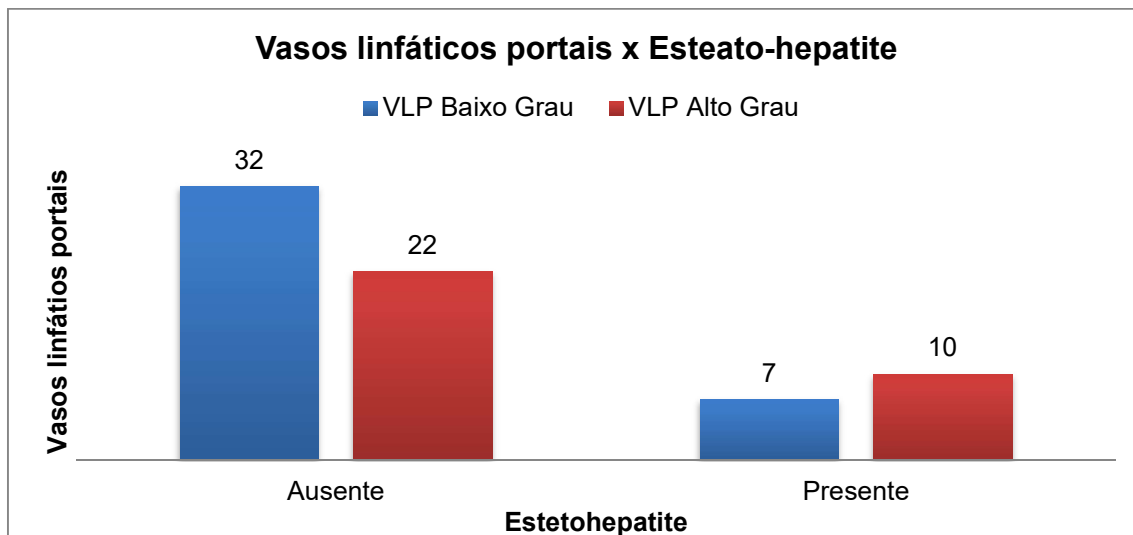


Anexo WWWW. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme ausência ou presença esteato-hepatite

| | | Brotos linfáticos portais | | |
|------------------|----------|---------------------------|---------------|-------------|
| | | BLP Baixo Grau | BLP Alto Grau | Total Geral |
| Esteato-hepatite | Ausente | 32 | 22 | 54 |
| | Presente | 8 | 9 | 17 |
| Total Geral | | 40 | 31 | 71 |

p=0,37

Anexo XXXX. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme ausência ou presença de esteato-hepatite

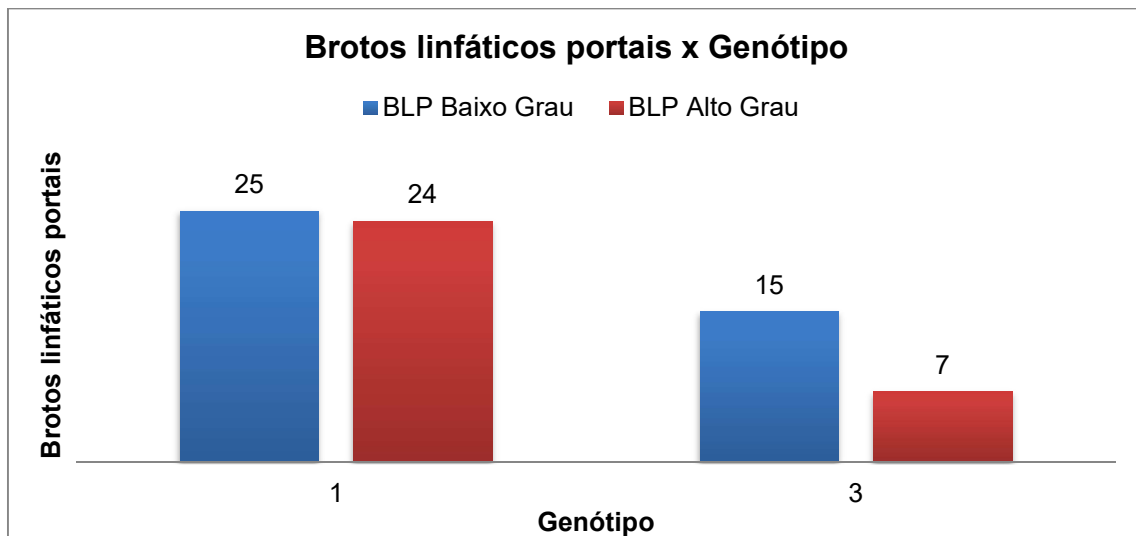


Anexo YYYY. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme ausência ou presença de esteato-hepatite

| | | Vasos linfáticos portais | | |
|------------------|----------|--------------------------|---------------|-------------|
| | | VLP Baixo Grau | VLP Alto Grau | Total Geral |
| Esteato-hepatite | Ausente | 32 | 22 | 54 |
| | Presente | 7 | 10 | 17 |
| Total Geral | | 39 | 32 | 71 |

p=0,19

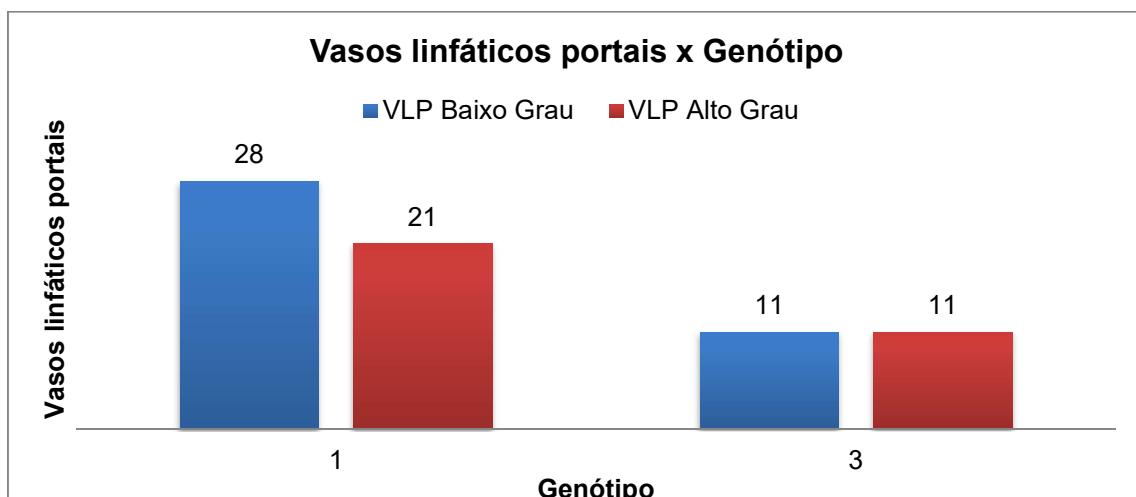
Anexo ZZZZ. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme genótipo



Anexo AAAAA. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de brotos linfáticos portais conforme genótipo

| | | Brotos linfáticos portais | | | p=0,17 |
|-------------|---|---------------------------|---------------|-------------|--------|
| | | BLP Baixo Grau | BLP Alto Grau | Total Geral | |
| Genótipo | 1 | 25 | 24 | 49 | |
| | 3 | 15 | 7 | 22 | |
| Total Geral | | 40 | 31 | 71 | |

Anexo BBBB. Distribuição de casos com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme genótipo

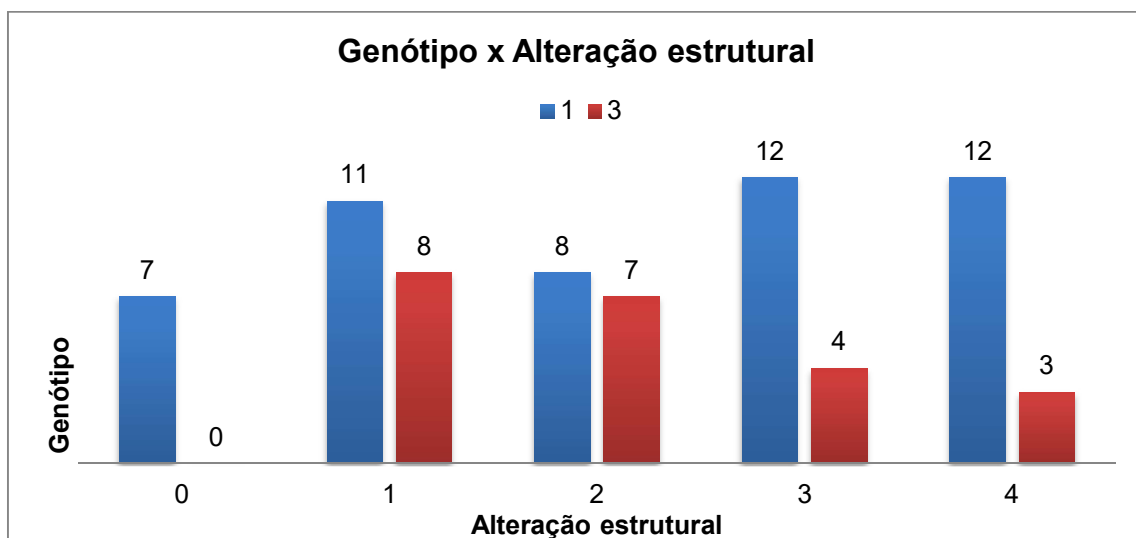


Anexo CCCCC. Distribuição de casos separados com baixa ou alta quantidade de vasos linfáticos portais conforme genótipo

| | | Vasos linfáticos portais | | |
|-------------|---|--------------------------|------------------|-------------|
| | | VLP Baixo Grau | VLP Alto Grau | Total Geral |
| Genótipo | 1 | 28 | 21 | 49 |
| | 3 | 11 | 11 | 22 |
| Total Geral | | 39 | 32 | 71 |

p=0,57

Anexo DDDDD. Distribuição de casos por genótipo conforme as alterações estruturais

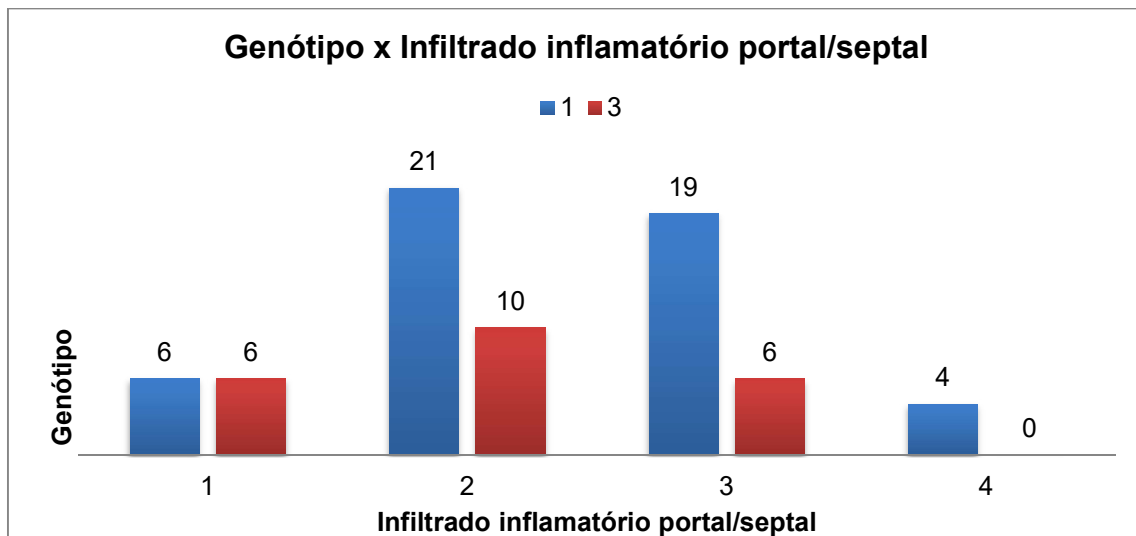


Anexo EEEEE. Distribuição de casos separados por genótipo de acordo com a mediana da alteração estrutural

| | | Genótipo | | |
|----------------------|-------|----------|----|-------------|
| | | 1 | 3 | Total Geral |
| Alteração estrutural | 0-1-2 | 26 | 15 | 41 |
| | 3-4 | 24 | 7 | 31 |
| Total Geral | | 50 | 22 | 72 |

p=0,20

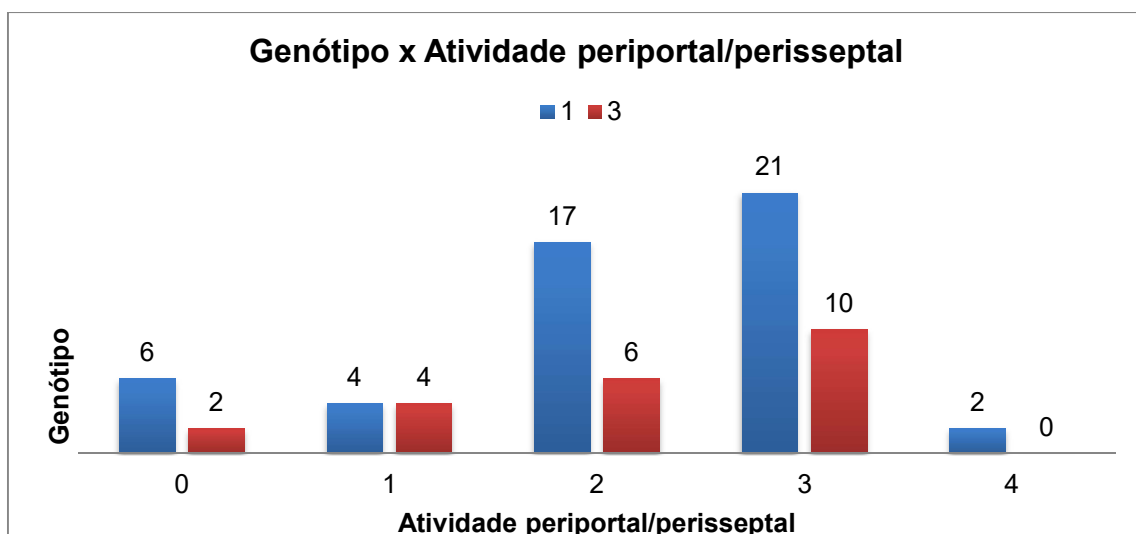
Anexo FFFFF. Distribuição de casos por genótipo conforme os graus de infiltrado inflamatório portal/septal



Anexo GGGGG. Distribuição de casos separados por genótipo de acordo com a mediana do infiltrado inflamatório portal/septal

| | | Genótipo | | | p=0,13 |
|---------------------------------------|-------|----------|----|-------------|--------|
| | | 1 | 3 | Total Geral | |
| Infiltrado inflamatório portal/septal | 0-1-2 | 27 | 16 | 43 | |
| | 3-4 | 23 | 6 | 29 | |
| Total Geral | | 50 | 22 | 72 | |

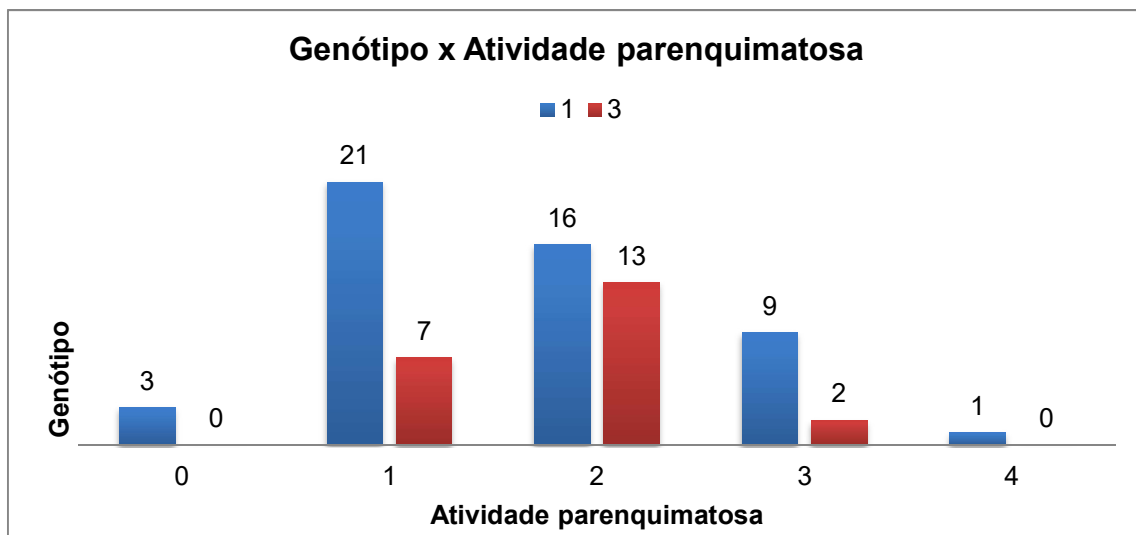
Anexo HHHHH. Distribuição de casos por genótipo conforme os graus de atividade periportal/perisseptal



Anexo IIIII. Distribuição de casos separados por genótipo de acordo com a mediana da atividade periportal/perisseptal.

| | | Genótipo | | | p=0,96 |
|-------------------------------------|-------------|----------|----|-------------|--------|
| | | 1 | 3 | Total Geral | |
| Atividade periporta/ perisseptal | 0-1-2 | 27 | 12 | 39 | |
| | 3-4 | 23 | 10 | 33 | |
| | Total Geral | 50 | 22 | 72 | |

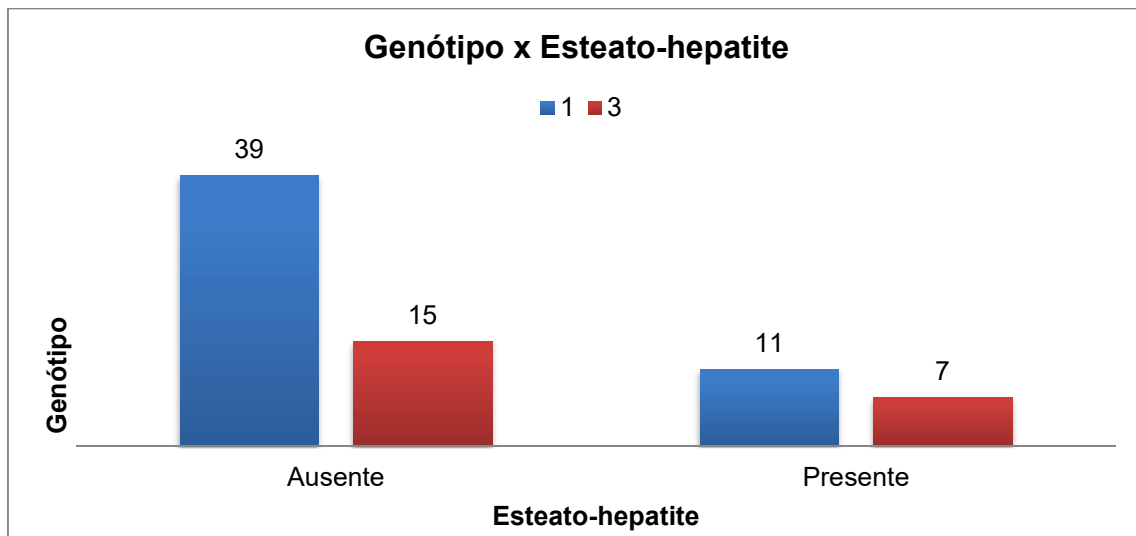
Anexo JJJJJ. Distribuição de casos por genótipo conforme os graus de atividade parenquimatosa



Anexo KKKKK. Distribuição de casos separados por genótipo de acordo com a mediana da atividade parenquimatosa

| | | Genótipo | | | p=0,20 |
|-----------------------------|-------------|----------|----|-------------|--------|
| | | 1 | 3 | Total Geral | |
| Atividade parenquimatosa | 0-1 | 24 | 7 | 31 | |
| | 2-3-4 | 26 | 15 | 41 | |
| | Total Geral | 50 | 22 | 72 | |

Anexo LLLLL. Distribuição de casos por genótipo conforme ausência ou presença de esteato-hepatite



Anexo MMMMM. Distribuição de casos por genótipo conforme ausência ou presença de esteato-hepatite

| | | Genótipo | | | p=0,37 |
|------------------|----------|----------|----|-------------|--------|
| | | 1 | 3 | Total Geral | |
| Esteato-hepatite | Ausente | 39 | 15 | 54 | |
| | Presente | 11 | 7 | 18 | |
| Total Geral | | 50 | 22 | 72 | |

Anexo NNNNN. Dados originais das amostras selecionadas – Dados cadastrais

| | GENÉRO | DATA NASCIMENTO | IDADE |
|---|--------|-----------------|-------|
| 1 | M | 16/11/1957 | 45 |
| 2 | F | 14/01/1960 | 45 |
| 3 | F | 06/12/1954 | 50 |
| 4 | M | 09/11/1955 | 46 |
| 5 | M | 16/04/1974 | 32 |
| 6 | M | 21/09/1984 | 22 |
| 7 | M | 31/12/1953 | 54 |
| 8 | F | 24/04/1953 | 54 |

| | GENÉRO | DATA NASCIMENTO | IDADE |
|----|--------|-----------------|-------|
| 9 | F | 10/05/1947 | 61 |
| 10 | M | 14/08/1961 | 47 |
| 11 | F | 17/12/1950 | 58 |
| 12 | F | 23/03/1964 | 45 |
| 13 | F | 26/06/1946 | 63 |
| 14 | M | 03/05/1974 | 35 |
| 15 | F | 24/08/1982 | 27 |
| 16 | F | 10/12/1967 | 43 |
| 17 | F | 13/07/1959 | 51 |
| 18 | F | 24/03/1962 | 48 |
| 19 | M | 08/05/1960 | 50 |
| 20 | M | 10/10/1957 | 53 |
| 21 | F | 19/06/1958 | 53 |
| 22 | M | 01/10/1971 | 40 |
| 23 | M | 29/01/1966 | 45 |
| 24 | M | 22/08/1960 | 51 |
| 25 | F | 28/09/1974 | 38 |
| 26 | F | 08/05/1956 | 55 |
| 27 | M | 24/06/1967 | 44 |
| 28 | M | 16/06/1978 | 34 |
| 29 | M | 29/09/1975 | 36 |
| 30 | M | 05/02/1966 | 46 |
| 31 | F | 23/12/1943 | 68 |
| 32 | M | 02/11/1958 | 53 |
| 33 | F | 09/08/1977 | 35 |
| 34 | M | 01/09/1979 | 33 |
| 35 | F | 17/05/1960 | 52 |
| 36 | F | 08/12/1946 | 65 |
| 37 | F | 13/07/1956 | 56 |
| 38 | M | 18/05/1958 | 54 |
| 39 | F | 25/08/1976 | 36 |
| 40 | M | 27/06/1953 | 59 |
| 41 | F | 30/07/1954 | 58 |
| 42 | M | 14/12/1979 | 32 |
| 43 | M | 03/08/1977 | 35 |
| 44 | M | 27/02/1978 | 34 |
| 45 | F | 14/12/1968 | 43 |
| 46 | F | 01/01/1977 | 35 |
| 47 | F | 13/02/1937 | 75 |
| 48 | F | 18/05/1959 | 53 |
| 49 | F | 02/04/1959 | 53 |
| 50 | F | 30/10/1963 | 49 |
| 51 | M | 20/10/1957 | 55 |

| | GENÉRO | DATA NASCIMENTO | IDADE |
|----|--------|-----------------|-------|
| 52 | F | 24/12/1956 | 55 |
| 53 | M | 20/01/1978 | 35 |
| 54 | F | 21/02/1953 | 60 |
| 55 | F | 04/10/1963 | 49 |
| 56 | F | 05/11/1978 | 34 |
| 57 | F | 21/01/1953 | 60 |
| 58 | F | 04/03/1958 | 55 |
| 59 | F | 05/02/1965 | 48 |
| 60 | M | 03/02/1954 | 59 |
| 61 | F | 15/02/1955 | 59 |
| 62 | F | 22/02/1964 | 50 |
| 63 | F | 09/07/1956 | 58 |
| 64 | F | 12/04/1978 | 36 |
| 65 | F | 24/10/1966 | 47 |
| 66 | M | 05/10/1956 | 58 |
| 67 | F | 31/01/1955 | 59 |
| 68 | F | 22/11/1935 | 78 |
| 69 | F | 03/05/1952 | 62 |
| 70 | M | 07/06/1976 | 38 |
| 71 | M | 25/11/1984 | 30 |
| 72 | F | 17/10/1943 | 71 |

Anexo OOOOO. Dados originais das amostras selecionadas – Dados moleculares continuação

| MÉTODOS MOLECULARES | | | | | | | |
|---------------------|------------------|-------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------------|---|
| CASO | DATA GENOTIPAGEM | GENOTIPAGEM | MÉTODO UTILIZADO GENOTIPAGEM | DATA CARGA VIRAL | PCR QUANTITATIVA HCV (UI/mL) | PCR QUANTITATIVA HCV (Log) | MÉTODO UTILIZADO CARGA VIRAL |
| 1 | 13/01/2016 | 3 | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 07/11/2012 | 356635 | 5,55 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 2 | 09/04/2013 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 10/01/2012 | 1887774 | 6,28 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 3 | 12/06/2006 | 3a | INNO-LiPA® v. 1.0 Versant HCV Genotype Assay | 16/01/2001 | Acima de 850.000 (Plasma) IAL | - | AMPLICOR HCV MONITOR tm, versao 2.0 - Roche Diagnostics |
| 4 | 17/03/2003 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 23/04/2012 | Abaixo do limite inferior de detecção | Abaixo do limite inferior de detecção | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 5 | 06/07/2005 | 3a | INNO-LiPA® v. 1.0 Versant HCV Genotype Assay | 10/08/2012 | Abaixo do limite inferior de detecção | Abaixo do limite inferior de detecção | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 6 | 18/12/2002 | 3a | INNO-LiPA® v. 1.0 Versant HCV Genotype Assay | Não foi realizada carga viral | - | - | - |
| 7 | 07/12/2015 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 08/08/2014 | 490484 | 5,69 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 8 | 26/03/2003 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics | 01/03/2005 | 487908 (Plasma) | 5,7 | AMPLICOR HCV MONITOR tm, versao 2.0 - Roche Diagnostics |
| 9 | 15/08/2011 | 3a | HCV VERSANT® (LiPA) | 20/09/2011 | 2835147 | 6,45 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 10 | 06/04/2005 | 1a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics | 24/09/2010 | Acima de limite superior de detecção 100.000.000 | - | AMPLICOR HCV MONITOR v2.0 Roche Diagnostics |
| 11 | 15/07/2014 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 20/01/2010 | Acima de limite superior de detecção 100.000.000 | - | AMPLICOR HCV MONITOR v2.0 Roche Diagnostics |
| 12 | 27/10/2009 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 13/11/2012 | Abaixo do limite inferior de detecção | Abaixo do limite inferior de detecção | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 13 | 01/03/2016 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 01/03/2016 | 3981806 | 6,6 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 14 | 10/03/2009 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 04/02/2013 | 289601 | 5,46 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 15 | 12/11/2012 | 1a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 24/05/2011 | 17354663 | 7,24 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 16 | 08/05/2006 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 29/09/2016 | 567137 | 5,75 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 17 | 30/05/2008 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 20/08/2014 | 316228 | 5,5 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 18 | 27/03/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 31/10/2012 | 287175 | 5,46 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 19 | 26/06/2013 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 05/07/2012 | 534287 | 5,73 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 20 | 29/06/2011 | 3a | HCV VERSANT® (LiPA) | 05/12/2011 | Abaixo de limite inferior de Detecção | Abaixo de limite inferior de Detecção | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |

ANEXO

| CASO | DATA GENOTIPAGEM | GENOTIPAGEM | MÉTODO UTILIZADO GENOTIPAGEM | DATA CARGA VIRAL | PCR QUANTITATIVA HCV (UI/mL) | PCR QUANTITATIVA HCV (Log) | MÉTODO UTILIZADO CARGA VIRAL |
|------|------------------|-------------|--|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| 21 | 27/03/2003 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics | 27/02/2014 | 561562 | 5,75 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 22 | 01/10/2013 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | Não foi realizada carga viral | - | - | - |
| 23 | 24/01/2005 | 1 | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics | 27/02/2013 | 3949058 | 6,6 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 24 | 05/05/2006 | 1a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | Não foi realizada carga viral | - | - | - |
| 25 | 22/03/2016 | 3 | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 22/03/2016 | 756791 | 5,88 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 26 | 24/02/2012 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 06/01/2015 | 184080 | 5,27 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 27 | 05/05/2003 | 1a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics | 28/03/2013 | 2631842 | 6,42 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 28 | 02/08/2012 | 1a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 02/08/2012 | 2175051 | 6,34 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 29 | 25/11/2015 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 27/08/2012 | 1204799 | 6,08 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 30 | 25/06/2004 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 03/09/2012 | 30496 | 4,48 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 31 | 18/08/2017 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 10/09/2012 | 3121912 | 6,49 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 32 | 11/07/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 11/07/2012 | 4.973.319 | 6,70 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 33 | 12/09/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 12/09/2012 | 9488 | 3,98 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 34 | 03/07/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 17/01/2018 | 570689 | 5,76 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 35 | 15/03/2016 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 25/02/2014 | 462445 | 5,67 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 36 | 24/09/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 03/08/2012 | 1026819 | 6,01 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 37 | 18/10/2011 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 01/10/2012 | 486224 | 5,69 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 38 | 22/10/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 22/10/2012 | 858259 | 5,93 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 39 | 05/11/2012 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 05/11/2012 | 1010186 | 6,00 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 40 | 05/04/2010 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 03/10/2012 | 576596 | 5,76 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 41 | 30/10/2016 | 1a | Centro de Triagem e Análise de Genoma Ltda (CATG) | 23/10/2012 | 529485 | 5,72 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 42 | 31/03/2005 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics | 18/09/2012 | 1624431 | 6,21 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 43 | 07/11/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 07/11/2012 | 2304103 | 6,36 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 44 | 04/09/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 04/09/2012 | 278006 | 5,44 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 45 | 26/09/2007 | 1a/1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 03/10/2012 | 371206 | 5,57 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 46 | 02/08/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 28/11/2012 | 1098547 | 6,04 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 47 | 03/12/2012 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 03/12/2012 | 922465 | 5,96 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 48 | 23/01/2018 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 12/12/2012 | 50407 | 4,70 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 49 | 30/10/2017 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 01/11/2012 | 2782532 | 6,44 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |

ANEXO

| CASO | DATA GENOTIPAGEM | GENOTIPAGEM | MÉTODO UTILIZADO GENOTIPAGEM | DATA CARGA VIRAL | PCR QUANTITATIVA HCV (UI/mL) | PCR QUANTITATIVA HCV (Log) | MÉTODO UTILIZADO CARGA VIRAL |
|------|------------------|-------------|--|------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 50 | 30/01/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 30/01/2014 | 99035 | 5 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 51 | 10/10/2013 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 10/10/2013 | 2874920 | 6,46 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 52 | 19/09/2012 | 1b | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 31/07/2013 | 1310181 | 6,12 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 53 | 16/05/2013 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 16/05/2013 | 1137219 | 6,06 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 54 | 10/06/2013 | 3 | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 10/06/2013 | 128664 | 5,11 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 55 | 18/04/2016 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 18/04/2016 | 1689877 | 6,23 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 56 | 10/01/2013 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 18/09/2013 | 1608723 | 6,21 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 57 | 18/06/2013 | 3 | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 18/09/2013 | 154 | 2,19 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 58 | 11/09/2013 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 11/09/2013 | 1357522 | 6,13 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 59 | 27/06/2013 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 02/10/2013 | 5598519 | 6,75 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 60 | 11/04/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 08/05/2013 | 604003 | 5,78 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 61 | 16/01/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 16/01/2014 | 151402 | 5,18 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 62 | 20/09/2002 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 25/08/2015 | 1277469 | 6,11 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 63 | 13/01/2010 | 3a | INNO-LiPA HCV II - Innogenetics (SIEMENS) | 24/04/2018 | 854952 | 5,93 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 64 | 28/05/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 25/03/2014 | 68350 | 4,83 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 65 | 05/09/2014 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 05/09/2014 | 1453268 | 6,16 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 66 | 19/03/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 19/03/2014 | 260114 | 5,42 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 67 | 25/09/2014 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 05/11/2015 | Abaixo do limite inferior de detecção | Abaixo do limite inferior de detecção | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 68 | 23/11/2015 | 1b | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 25/07/2014 | 644726 | 5,81 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 69 | 25/09/2014 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 24/06/2014 | 1897252 | 6,28 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 70 | 14/06/2011 | 3a | HCV VERSANT® (LiPA) | 07/03/2017 | 7750921 | 6,89 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 71 | 10/10/2017 | 1a | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 18/07/2014 | 100000 | 5 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |
| 72 | 27/05/2014 | 1 | PCR em Tempo Real (Abbott Real Time HCV Genotype II) | 02/02/2016 | 194892 | 5,29 | PCR em Tempo Real Abbott Real Time HCV |

Anexo PPPPP. Dados originais das amostras selecionadas – Dados bioquímicos

| | FUNÇÃO HEPÁTICA | | | | | | | | | | |
|----|-----------------|-----------|-----------|----------|------------------------------------|-------------------|---------------|--|----------------------------|-----------------------------|------------|
| | AST (U/L) | ALT (U/L) | GGT (U/L) | FA (U/L) | DATA AST, ALT, GGT E FA | FERRITINA (ng/ml) | FERRO (mg/dl) | DATA FERRITINA E FERRO | BILIRRUBINA DIRETA (mg/dl) | BILIRUBINA INDIRETA (mg/dl) | DATA BDEBI |
| 1 | 131 | 277 | 49 | 52 | 12/02/2003 / 26/05/2003 (FA e GGT) | 2844 | 197 | 26/03/2010 | 0,2 | 0,6 | 26/05/2003 |
| 2 | 63,00 | 73,00 | 98,00 | 77,00 | 11/01/2005 | - | - | - | 0,22 | 0,35 | 18/07/2006 |
| 3 | 40,00 | 52,00 | 26,00 | 48,00 | 02/05/2005 | 278 | 140 | 07/11/2008 | 0,2 | 0,4 | 02/05/2005 |
| 4 | 31,00 | 30,00 | 23,00 | 53,00 | 15/05/2003 | 273 | 108 | 13/10/2006 | 0,1 | 0,5 | 15/05/2003 |
| 5 | 111,00 | 177,00 | 81,00 | 94,00 | 06/11/2006 | - | - | - | 0,48 | 0,78 | 06/11/2006 |
| 6 | 26,00 | 41,00 | 14,00 | 77,00 | 03/10/2006 | - | - | - | 0,33 | 0,7 | 03/10/2006 |
| 7 | 101 | 165,00 | 135,00 | 67,00 | 03/10/2007 | 389 | 215 | 30/03/2009 (FERRIT) / 14/11/2008 (FERRO) | 0,28 | 0,57 | 03/10/2007 |
| 8 | 138,00 | 181,00 | 58,00 | 137,00 | 29/02/2008 | 298 | 181 | 04/07/2008 (FERRIT) / 18/11/2015 (FERRO) | 0,19 | 0,32 | 29/02/2008 |
| 9 | 73,00 | 94,00 | 335,00 | 91,00 | 05/12/2008 | 124 | 61 | 26/07/2006 (FERRIT) / 15/08/2011 (FERRO) | 0,28 | 0,52 | 05/12/2008 |
| 10 | 71,00 | 80,00 | 32,00 | 64,00 | 24/09/2009 | 1309 | 233 | 21/02/2013 | 0,05 | 0,15 | 24/09/2009 |
| 11 | 129,00 | 161,00 | 31,00 | 62,00 | 22/05/2009 | 221 | 128 | 18/05/2007 | 0,28 | 0,44 | 22/05/2009 |
| 12 | 46,00 | 56,00 | 20,00 | 84,00 | 15/10/2009 | 66 | 109 | 15/10/2009 | 0,1 | 0,21 | 15/09/2009 |
| 13 | 51,00 | 50,00 | 52,00 | 60,00 | 30/07/2009 | 81 | 109 | 09/10/2007 | 0,11 | 0,28 | 30/07/2009 |
| 14 | 100,00 | 75,00 | 418,00 | 69,00 | 13/02/2009 | 299 | 142 | 13/02/2009 | 0,32 | 0,45 | 13/02/2009 |
| 15 | 28,00 | 24,00 | 67,00 | 59,00 | 16/07/2010 | - | - | - | 0,30 | 0,34 | 16/07/2010 |
| 16 | 29,00 | 36,00 | 107,00 | 110,00 | 23/11/2010 / 10/02/2010 (FA) | 55 | 99 | 22/11/2007 (FERRIT) / 22/08/2013 (FERRO) | 0,09 | 0,23 | 23/11/2010 |
| 17 | 56,00 | 43,00 | 188,00 | 110,00 | 21/01/2011 | 24 | 142 | 21/01/2011 (FERRIT) / 17/11/2015 (FERRO) | 0,05 | 0,44 | 21/01/2011 |
| 18 | 88 | 68 | 96 | 86 | 27/01/2011 | 40 | 66 | 27/01/2011 | 0,22 | 0,29 | 27/01/2011 |
| 19 | 51,00 | 67,00 | 266,00 | 69,00 | 10/05/2011 | - | - | - | 0,38 | 0,70 | 10/05/2011 |
| 20 | 42,00 | 61,00 | 91,00 | 70,00 | 06/04/2011 | 2617 | 247 | 07/02/2012 | 0,37 | 0,81 | 06/04/2011 |

ANEXO

| | AST (U/L) | ALT (U/L) | GGT (U/L) | FA (U/L) | DATA AST, ALT, GGT E FA | FERRITI NA (ng/ml) | FERRO (mg/dl) | DATA FERRITINA E FERRO | BILIRRU BINA DIRETA (mg/dl) | BILIRUBI NA INDIR ETA (mg/dl) | DATA BD E BI |
|----|--------------|--------------|--------------|-------------|------------------------------------|--------------------------|------------------|---|--------------------------------------|---|-----------------|
| 45 | 47,00 | 58,00 | 51,00 | 48,00 | 26/11/2012 / 03/10/2012 (FA) | 101 | 71 | 23/02/2012 (FERRIT) / 03/10/2012 (FERRO) | 0,17 | 0,26 | 03/10/2012 |
| 46 | 27,00 | 36,00 | 12,00 | 79,00 | 28/11/2012 | - | - | - | 0,19 | 0,14 | 02/08/2012 |
| 47 | 51,00 | 42,00 | 31,00 | 68,00 | 03/12/2012 | - | - | - | 0,20 | 0,20 | 19/10/2012 |
| 48 | 30,00 | 34,00 | 21,00 | 73,00 | 12/12/2012 | - | - | - | 0,20 | 0,34 | 02/07/2012 |
| 49 | 25,00 | 29,00 | 241,0 0 | 104,0 0 | 18/10/2012 | 25,1 | 133 | 06/05/2013 (FERRIT) / 07/10/2014 (FERRO) | 0,16 | 0,13 | 18/10/2012 |
| 50 | 171,00 | 145,0 0 | 89,00 | 85,00 | 03/12/2012 | 256,80 | 145 | 04/04/2014 | 0,53 | 0,38 | 03/12/2012 |
| 51 | 133,00 | 180,0 0 | 442,0 0 | 77,00 | 06/06/2013 | 68,3 | 113 | 23/09/2016 | 0,51 | 0,38 | 06/06/2013 |
| 52 | 36,00 | 36,00 | 31,00 | 58,00 | 31/07/2013 | - | - | - | 0,24 | 0,24 | 31/07/2013 |
| 53 | 94 | 123 | 394 | 49 | 16/05/2013 | - | - | - | 0,94 | 0,47 | 16/05/2013 |
| 54 | 56,00 | 71,00 | 73,00 | 134,0 0 | 10/06/2013 | 787,7 | 245 | 10/06/2013 | 0,22 | 0,37 | 10/06/2013 |
| 55 | 60,00 | 60,00 | 39,00 | 105,0 0 | 27/05/2013 | 250,3 | 67 | 27/05/2013 | 0,11 | 0,18 | 27/05/2013 |
| 56 | 53,00 | 83,00 | 38,00 | 58,00 | 18/09/2013 / 01/10/2013 (FA) | - | - | - | 0,23 | 0,43 | 10/01/2013 |
| 57 | 17,00 | 16,00 | 20,00 | 74,00 | 18/09/2013 | 35 | 145 | 14/08/2013 | 0,14 | 0,18 | 14/08/2013 |
| 58 | 191 | 166 | 280 | 141 | 11/09/2013 | - | - | - | 0,34 | 0,37 | 11/09/2013 |
| 59 | 37,00 | 40,00 | 57,00 | 78,00 | 25/10/2013 | 215,3 | 124 | 27/06/2013 | 0,38 | 0,49 | 25/10/2013 |
| 60 | 74,00 | 94,00 | 253,0 0 | 94,00 | 08/05/2013 | 150 | - | 15/06/2016 | 0,46 | 0,33 | 08/05/2013 |
| 61 | 92,00 | 77,00 | 81,00 | 113,0 0 | 13/02/2014 | 334,8 | 127 | 06/02/2014 (FERRIT) / 08/12/2015 (FERRO) | 0,35 | 0,32 | 13/02/2014 |
| 62 | 41,00 | 54,00 | 86,00 | 81,00 | 21/03/2014 | 152 | 136 | 21/01/2010 | 0,44 | 0,34 | 21/03/2014 |
| 63 | 38,00 | 40,00 | 59,00 | 60,00 | 27/06/2014 | 10 | 58 | 13/11/2009 | 0,32 | 0,46 | 27/06/2014 |
| 64 | 40,00 | 47,00 | 28,00 | 55,00 | 28/05/2014 | - | - | - | 0,33 | 0,44 | 28/05/2014 |
| 65 | 42,00 | 38,00 | 34,00 | 58,00 | 22/12/2014 | 5,3 | 110 | 22/12/2014 (FERRIT) / 04/05/2015 (FERRO) | 0,11 | 0,05 | 22/12/2014 |
| 66 | 33,00 | 34,00 | 86,00 | 93,00 | 19/03/2014 | - | - | - | 0,35 | 0,51 | 19/03/2014 |
| 67 | 107,00 | 149,0 0 | 111,0 0 | 137,0 0 | 11/09/2014 | 210,1 | 101 | 17/01/2014 (FERRIT) / 27/10/2015 (FERRO) | 0,51 | 0,64 | 11/09/2014 |
| 68 | 44,00 | 67,00 | 108,0 0 | 100,0 0 | 25/07/2014 | - | - | - | 0,50 | 0,30 | 25/07/2014 |
| 69 | 95,00 | 106,0 0 | 216,0 0 | 167,0 0 | 31/10/2014 | - | - | - | 0,32 | 0,13 | 31/10/2014 |

ANEXO

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|------------|---|---|---|------|------|------------|
| 70 | 30,00 | 68,00 | 70,00 | 49,00 | 15/07/2014 | - | - | - | 0,22 | 0,2 | 15/07/2014 |
| 71 | 33,00 | 33,00 | 39,00 | 47,00 | 25/02/2015 | - | - | - | 0,22 | 0,35 | 25/02/2015 |
| 72 | 57,00 | 70,00 | 50,00 | 82,00 | 15/01/2015 | - | - | - | 0,21 | 0,2 | 15/01/2015 |

8. REFERÊNCIAS

1. Theise, ND. In: Kumar, Abbas, Aster, editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 821-875: The liver and bile ducts.
2. McPhee & Ganong, editors. *Fisiopatologia da Doença. Uma Introdução à Medicina Clínica*. Nguyen TT, Lingappa VR. 5ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2007, p. 332: Doença hepática.
3. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* [Internet]. 2004;37(1):16-28. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00795-003-0228-x>
4. Peng H, Wisse E, Tian Z. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2016;13(3):328-336. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856807/>
5. Mills, SE. *Histology for pathologists*. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
6. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica: texto e atlas*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. cap. 11, p. 200-216: Sistema Circulatório.
7. Le Bail B, Bioulac-Sage P, Senuita R, Quinton A, Saric J, Balabaud C. Fine structure of hepatic sinusoids and sinusoidal cells in disease. *J Electron Microsc* *Tech* [Internet]. 1990;14(3):257-282. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.1060140307>
8. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, Klavan H, Reidy J, Buonocore D, Miranda M, Kornacki S, Wayne M, Carr-Locke DL, Theise ND. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):4947. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869738/>

9. Cenaj O, Allison DHR, Imam R, Zeck B, Drohan LM, Chiriboga L, Llewellyn J, Liu CZ, Park YN, Wells RG, Theise ND. Evidence for continuity of interstitial spaces across tissue and organ boundaries in humans. *Commun Biol* [Internet]. 2021;4(1):436. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8012658/>
10. Chaparro M, Sanz-Cameno P, Trapero-Marugan M, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Mechanisms of angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Ann Hepatol* [Internet]. 2007;6(4):208-213. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31900-3](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31900-3)
11. Hassan M, Selimovic D, El-Khattouti A, Soell M, Ghozlan H, Haikel Y, Abdelkader O, Megahed M. Hepatitis C virus-mediated angiogenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(42):15467-15475. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229513/>
12. Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010;16(3):281-288. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807946/>
13. Elpek GÖ. Angiogenesis and liver fibrosis. *World J Hepatol* [Internet]. 2015;7(3):377-391. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4381164/>
14. Cui S, Hano H, Sakata A, Harada T, Liu T, Takai S, Ushigome S. Enhanced CD34 expression of sinusoid-like vascular endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int* [Internet]. 1996;46(10):751-756. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8916144/>
15. Maeda MFY, Silva CD, Harima LS, Silva LFF, Ctenas B, Alves VAF. Vascularização na cirrose hepática: estudo imunoistoquímico baseado em

necropsias. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2008;45(1):38-45. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/ZgM3tLhJc8RDfGZYnthbJbr/?format=pdf&lang=pt>

16. Hoofring A, Boitnott J, Torbenson M. Three-dimensional reconstruction of hepatic bridging fibrosis in chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* [Internet]. 2003;39(5):738-741. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568255/>

17. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC. Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis - current status and future directions. *J Hepatol* [Internet]. 2014;61(4):912-924. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24911462/>

18. Fraisl P. Crosstalk between oxygen- and nitric oxide-dependent signaling pathways in angiogenesis. *Exp Cell Res* [Internet]. 2013;319(9):1331-1339. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.02.010>

19. Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2004;39(5):1185-1195. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15122744/>

20. Wilson GK, Brimacombe CL, Rowe IA, Reynolds GM, Fletcher NF, Stamatakis Z, Bhogal RH, Simões ML, Ashcroft M, Afford SC, Mitry RR, Dhawan A, Mee CJ, Hübscher SG, Balfe P, McKeating JA. A dual role for hypoxia inducible factor-1 α in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration. *J Hepatol* [Internet]. 2012;56(4):803-809. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178269/>

21. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* [Internet]. 2008;4(4):241-246. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19337404/>

22. Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Dev Biol* [Internet]. 2012;372(2):157-165. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23031691/>
23. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* [Internet]. 2000;6(4):389-395. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10742145/>
24. Yu E, Choe G, Gong G, Lee I. Expression of alpha-smooth muscle actin in liver diseases. *J Korean Med Sci* [Internet]. 1993;8(5):367-373. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3053712/>
25. Bertolani C, Marra F. The role of adipokines in liver fibrosis. *Pathophysiology* [Internet]. 2008;15(2):91-101. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18602801/>
26. Guido M, Sarcognato S, Russo FP, Cardin R, Picciocchi M, Colloredo G, Farinati F. Focus on histological abnormalities of intrahepatic vasculature in chronic viral hepatitis. *Liver Int* [Internet]. 2018;38(10):1770-1776. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29427537/>
27. Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010;16(3):281-288. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807946/>
28. Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver. *Anat Rec (Hoboken)* [Internet]. 2008;291(6):643-652. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.20681>
29. Tanaka M, Iwakiri Y. The Hepatic Lymphatic Vascular System: Structure, Function, Markers, and Lymphangiogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*

[Internet]. 2016;2(6):733-749. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5240041/>

30. Tanaka M, Iwakiri Y. Lymphatics in the liver. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2018;53:137-142. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986420/>

31. Lukacs-Kornek V. The Role of Lymphatic Endothelial Cells in Liver Injury and Tumor Development. *Front Immunol* [Internet]. 2016;7:548. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5127193/>

32. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* [Internet]. 1999;98(6):769-778. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400815111?via%3Dihub>

33. Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* [Internet]. 2002;21(17):4593-4599. Disponível em:
<https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/cdf470>

34. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* [Internet]. 2002;21(7):1505-1513. Disponível em:
<https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/21.7.1505>

35. Yang Y, García-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Srinivasan RS, Scallan JP, Singh MK, Epstein JA, Oliver G. Lymphatic endothelial progenitors bud from the cardinal vein and intersomitic vessels in mammalian embryos. *Blood* [Internet]. 2012;120(11):2340-2348. Disponível em:
<https://ashpublications.org/blood/article/120/11/2340/30241/Lymphatic-endothelial-progenitors-bud-from-the>

36. Ji RC, Kato S. Enzyme-histochemical study on postnatal development of rat stomach lymphatic vessels. *Microvasc Res* [Internet]. 1997;54(1):1-12. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026286297920161?via%3Dihub>
37. Ji RC, Kato S. Lymphatic network and lymphangiogenesis in the gastric wall. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2003;51(3):331-338. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215540305100308?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&
38. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol* [Internet]. 2006;4(2):83-100. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/lrb.2006.4.83?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&
39. François M, Short K, Secker GA, Combes A, Schwarz Q, Davidson TL, Smyth I, Hong YK, Harvey NL, Koopman P. Segmental territories along the cardinal veins generate lymph sacs via a ballooning mechanism during embryonic lymphangiogenesis in mice. *Dev Biol* [Internet]. 2012;364(2):89-98. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160611014527?via%3Dihub>
40. Papke DJ Jr, Hornick JL. What is new in endothelial neoplasia? *Virchows Arch* [Internet]. 2020;476(1):17-28. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-019-02651-4>
41. Alves VAF, Rimola J. Malignant Vascular Tumors of the Liver in Adults. *Semin Liver Dis* [Internet]. 2019;39(1):1-12. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0038-1676120>

42. Guido M, Alves VAF, Balabaud C, Bathal PS, Bioulac-Sage P, Colombari R, Crawford JM, Dhillon AP, Ferrell LD, Gill RM, Hytioglou P, Nakanuma Y, Paradis V, Quaglia A, Rautou PE, Theise ND, Thung S, Tsui WMS, Sempoux C, Snover D, van Leeuwen DJ; International Liver Pathology Study Group. Histology of portal vascular changes associated with idiopathic non-cirrhotic portal hypertension: nomenclature and definition. *Histopathology* [Internet]. 2019;74(2):219-226. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.13738>

43. Oikawa H, Masuda T, Sato S, Yashima A, Suzuki K, Sato S, Satodate R. Changes in lymph vessels and portal veins in the portal tract of patients with idiopathic portal hypertension: a morphometric study. *Hepatology* [Internet]. 1998;27(6):1607-1610. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.510270621>

44. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* [Internet]. 2000;14(13):2087-2096. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.99-1049com>

45. Jakic B, Kerjaschki D, Wick G. Lymphatic Capillaries in Aging. *Gerontology* [Internet]. 2020;66(5):419-426. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000508459>

46. To B, Isaac D, Andrechek ER. Studying Lymphatic Metastasis in Breast Cancer: Current Models, Strategies, and Clinical Perspectives. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Internet]. 2020;25(3):191-203. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33034778/>

47. Yokomori H, Oda M, Kaneko F, Kawachi S, Tanabe M, Yoshimura K, Kitagawa Y, Hibi T. Lymphatic marker podoplanin/D2-40 in human advanced cirrhotic liver--re-evaluations of microlymphatic abnormalities. *BMC*

Gastroenterol [Internet]. 2010;10:131. Disponível em: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-10-131>

48. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* [Internet]. 2003;22(14):3546-3556. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/cdg342>

49. Mall FP. On the origin of the lymphatics in the liver. *Johns Hopkins Hosp Bulletin* [Internet]. 1901; 12:146–148. Disponível em: [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Paper_-_On_the_origin_of_the_lymphatics_in_the_liver_\(1901\)](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Paper_-_On_the_origin_of_the_lymphatics_in_the_liver_(1901))

50. Yamamoto K, Phillips MJ. Three-dimensional observation of the intrahepatic lymphatics by scanning electron microscopy of corrosion casts. *Anat Rec* [Internet]. 1986;214(1):67-70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ar.1092140111>

51. Frenkel NC, Poghosyan S, Verheem A, Padera TP, Rinkes IHMB, Kranenburg O, Hagendoorn J. Liver lymphatic drainage patterns follow segmental anatomy in a murine model. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):21808. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78727-y>

52. Burchill MA, Goldberg AR, Tamburini BAJ. Emerging Roles for Lymphatics in Chronic Liver Disease. *Front Physiol* [Internet]. 2020;10:1579. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6971163/>

53. Chung C, Iwakiri Y. The lymphatic vascular system in liver diseases: its role in ascites formation. *Clin Mol Hepatol* [Internet]. 2013;19(2):99-104. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3701854/>

54. Organization. *Global Hepatitis Reports, 2017*. Geneva: World Health Organization; 2017.

55. Ferreira CT, Silveira TR da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2004; 7(4):473-487. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/Hb5tXY8xRxp8ph8JjVRMXWS/?lang=pt&format=pdf>

56. Hanus JS, Ceretta LB, Simões PW, Tuon L. Incidence of hepatitis C in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2015;48(6):665-73. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/QyP3KBbsrGwzRq3cNHwf4tm/?lang=en&format=pdf>

57. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico Especial – Hepatites Virais, 2020*. Brazil; 2020 [accessed 13.11.20]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-hepatites-virais-2020>

58. Passos A. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. *Medicina (Ribeirao Preto Online)* [Internet]. 2003;36(1):30-6. Available from: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/523>

59. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13:60. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-60>

60. Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2001;34(1):69-82. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11340500/>

61. Venâncio SI, Bersusa AAS, Martins PN, Figueiredo G, Awakamatsu A, Alves VAF. Avaliação do processo de dispensação de medicamentos aos portadores de hepatite C crônica em farmácias de componentes

especializados da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, em 2010. *Epidemiol. Serv. Saúde* [Internet]. 2014; 23(4):701-710. Available from: <https://www.scielo.br/j/ress/a/Gz6pKzC7QN6QBv6Kprn4zGm/?lang=pt&format=pdf>

62. Leuw P, Stephan C. Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2018;19(6):577-587. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29595065/>

63. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* [Internet]. 2014;61(1 Suppl):S58-S68. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25443346/>

64. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology* [Internet]. 2011;8:161. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21477382/>

65. Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol* [Internet]. 2010;134(3):237-250. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.10.007>

66. Craxì A, Laffi G, Zignego AL. Hepatitis C virus (HCV) infection: a systemic disease. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2008;29(1-2):85-95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S009829970700101X>

67. Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(29):9633-9652. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25110404/>

68. Fang JW, Chow V, Lau JY. Virology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* [Internet]. 1997;1(3):493-514. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1089326105703172?via%3Dihub>

69. Mello ES, Alves VAF. Atlas de Patologia Hepática: hepatites virais, esteato-hepatite e carcinoma hepatocelular. São Paulo: Manole; 2010.

70. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* [Internet]. 2008;128(2):133-147. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514579/>

71. Mondelli MU, Cerino A, Cividini A. Acute hepatitis C: diagnosis and management. *J Hepatol* [Internet]. 2005;42 Suppl(1):S108-S114. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15777565/>

72. Iida VH, Silva TJ A da, Silva ASF, Silva LFF da, Alves VAF. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. *J. Bras. Patol. Med. Lab* [Internet]. 2005;41(1):29-36. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000100008>

73. Hytioglou P, Snover DC, Alves V, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Crawford JM, Dhillon AP, Ferrell L, Guido M, Nakanuma Y, Paradis V, Quaglia A, Theise ND, Thung SN, Tsui WM, van Leeuwen DJ. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2012;137(1):5-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22180471/>

74. Quaglia A, Alves VA, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Crawford JM, Dhillon AP, Ferrell L, Guido M, Hytioglou P, Nakanuma Y, Paradis V, Snover DC, Theise ND, Thung SN, Tsui WM, van Leeuwen DJ; International Liver Pathology Study Group. Role of aetiology in the progression, regression, and parenchymal remodelling of liver disease: implications for liver biopsy interpretation. *Histopathology* [Internet]. 2016;68(7):953-967. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26918878/>

75. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol* [Internet]. 2014;13(4):386-393. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24927609/>

76. Ragazzo TG, Paranagua-Vezozzo D, Lima FR, et al. Accuracy of transient elastography-FibroScan®, acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging, the enhanced liver fibrosis (ELF) test, APRI, and the FIB-4 index compared with liver biopsy in patients with chronic hepatitis C. *Clinics (Sao Paulo)* [Internet]. 2017;72(9):516-525. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29069254/>

77. Dhingra S, Ward SC, Thung SN. Liver pathology of hepatitis C, beyond grading and staging of the disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2016;22(4):1357-1366. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26819505/>

78. Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol* [Internet]. 2003;39(2):239-244. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12873821/>

79. Tublin ME, Blair R, Martin J, Malik S, Ruppert K, Demetris A. Prospective Study of the Impact of Liver Biopsy Core Size on Specimen Adequacy and Procedural Complications. *AJR Am J Roentgenol* [Internet]. 2018;210(1):183-188. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29091001/>

80. Nayak NC, Sathar SA. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus antigen in paraffin embedded liver biopsies from patients with chronic liver disease. *Acta Histochem* [Internet]. 1999;101(4):409-419. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10611929/>

81. Qian X, Guerrero RB, Plummer TB, Alves VF, Lloyd RV. Detection of hepatitis C virus RNA in formalin-fixed paraffin-embedded sections with digoxigenin-labeled cRNA probes. *Diagn Mol Pathol* [Internet]. 2004;13(1):9-14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15163003/>
82. Nouri-Aria KT, Sallie R, Mizokami M, Portmann BC, Williams R. Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. *J Pathol* [Internet]. 1995;175(1):77-83. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.1711750112>
83. Alves VAF. Hepatite C crônica: estudo de marcadores histológicos e imunohistoquímicos do vírus e da resposta imune dos pacientes. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1998 Fev; 31(1):109-112. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86821998000100016>
84. Song AT, Mello ES, Alves VA, Cavalheiro Nde P, Melo CE, Bonazzi PR, Tengan FM, Freire MP, Barone AA, D'Albuquerque LA, Abdala E. Quantification of C4d deposition and hepatitis C virus RNA in tissue in cases of graft rejection and hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2015;110(1):56-64. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/H7QMZTymz97JHnzPrFsZyVz/?format=pdf&lang=en>
85. Bittar C, Jardim AC, Yamasaki LH, de Queiróz AT, Carareto CM, Pinho JR, de Carvalho-Mello IM, Rahal P. Genetic diversity of NS5A protein from hepatitis C virus genotype 3a and its relationship to therapy response. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2010;10:36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2838888/>
86. Vieira DS, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Carrilho FJ, Pinho JR, Salcedo JM. Distribution of hepatitis c virus (hcv) genotypes in patients with chronic infection from Rondônia, Brazil. *Viro J* [Internet]. 2011;8:165. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21486472/>

87. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2005;38(1):41-49. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15665987/>
88. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA, Bello G. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther.* 2013;18(3):435-444. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792792/>
89. Jardim AC, Bittar C, Matos RPA, Yamasaki LHT, Silva RA, Pinho JRR, Fachini RM, Carareto CMA, Carvalho-Mello IMVG de, Rahal P. Analysis of HCV quasispecies dynamic under selective pressure of combined therapy. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13(61). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2334-13-61>
90. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, Salles NA, Mendrone A Jr, Sabino EC. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(1):e86413. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897703/>
91. Nishiya AS, Almeida-Neto Cd, Romano CM, Alencar CS, Ferreira SC, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, Salles NA, Mendrone-Junior A, Sabino EC. Phylogenetic analysis of the emergence of main hepatitis C virus subtypes in São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2015;19(5):473-478. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26296325/>

92. Mello ES, Alves VAF. Chronic hepatitis C: pathological anatomy. *Braz J Infect Dis* [Internet]. 2007; 11(5): 28-32. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjid/a/NTHBZFcqNZV3hQJn7mtkcJt/?format=pdf&lang=en>

93. Gayotto LCC, Alves VAF, Cerski CTS, Escanhoela CA, Nekkin ES, Freitas LAR, COMITÊ SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas: projeto do clube de patologia hepática da sociedade brasileira de patologia aprovado pela sociedade brasileira de hepatologia. *GED*. 2000;19(3): 137-140.

94. Coral G, Mattos AA, Mattos AZ, Santos DE. Esteatose e esteato-hepatite não-alcoólica nos pacientes com hepatite crônica pelo vírus da hepatite C. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2006;43(4):265-268. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/mYKzymzsH6Tvw4rCQpDWh4J/?lang=pt&format=pdf>

95. Rivas-Estilla AM, Lozano-Sepulveda SA. Where is the focus on hepatitis C research after the introduction of DAAs: To Understand, knowledge, prevent or cure hepatitis C?. *Ann Hepatol* [Internet]. 2020;19(2):119-120. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665268120300132?via%3Dihub>

96. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2005;41(6):1313-1321. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.20701>

97. Wanless IR, Sweeney G, Dhillon AP, Guido M, Piga A, Galanello R, Gamberini MR, Schwartz E, Cohen AR. Lack of progressive hepatic fibrosis during long-term therapy with deferiprone in subjects with transfusion-dependent

beta-thalassemia. *Blood* [Internet]. 2002;100(5):1566-1569. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-4971\(20\)59235-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-4971(20)59235-5)

98. 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* [Internet]. 2018;72(6):990-996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29235144/>

99. Celli R, Saffo S, Kamili S, Wiese N, Hayden T, Taddei T, Jain D. 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* [Internet]. 2021;145(4):419-427. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/145/4/419/442554/Liver-Pathologic-Changes-After-Direct-Acting>

100. Zadorozhna M, Di Gioia S, Conese M, Mangieri D. Neovascularization is a key feature of liver fibrosis progression: anti-angiogenesis as an innovative way of liver fibrosis treatment. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2020;47(3):2279-2288. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-05290-0>

101. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* [Internet]. 1989;244(4902):359-362. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/244/4902/359.long>

102. Pol S, Lagaye S. The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes Immun.* 2019;20(5):436-446. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31019253/>

103. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol* [Internet].

2016;22(34):7824-7840. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27678366/>

104. Cotrim, HP. Doença hepática gordurosa não doença hepática gordurosa não-alcoólica: História natural. *Gaz. med. Bahia* [Internet]. 2009;79 (Supl.2):46-47. Disponível em:
<http://gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1015/992>

105. Ponte, IM, de Sousa Lima, ME, Albuquerque, MCF, de Holanda Veloso, AF, & Bachur, TPR. Esteato-hepatite não alcoólica: uma síndrome em evidência. *Braz J Hea Rev* [Internet]. 2020;3(1):1077-1093. Disponível em:
<https://doi.org/10.34119/bjhrv3n1-084>

106. Younossi ZM, Stepanova M, Asselah T, Foster G, Patel K, Bräu N, Swain M, Tran T, Esteban R, Colombo M, Pianko S, Henry L, Bourliere M. Hepatitis C in Patients With Minimal or No Hepatic Fibrosis: The Impact of Treatment and Sustained Virologic Response on Patient-Reported Outcomes. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2018;66(11):1742-1750. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29272349/>

107. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, Younossi Z. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2017;3:17006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28252637/>

108. Sevastianos VA, Voulgaris TA, Dourakis SP. Hepatitis C, systemic inflammation and oxidative stress: correlations with metabolic diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020;14(1):27-37. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31868062/>

109. Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Epidemiological update of hepatitis B, C and delta in Latin America. *Antivir Ther* [Internet]. 2013;18(3 Pt B):429-433. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792375/>

110. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2005;38(1):41-49. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15665987/>
111. Minme R, Holzmann I, Tovo CV, Almeida PRL. Profile of patients with chronic hepatitis C in a public health program in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2018;55(4):403-406. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30785526/>
112. Mohammed Abdul MK, Snyder HS, Chundururu M, Lee SMK, Satapathy SK. Hepatitis C Virus in the Elderly in the Direct-Acting Antiviral Era: from Diagnosis to Cure. *Curr Treat Options Infect Dis* [Internet]. 2020;1-14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32837340/>
113. Negro F. Natural History of Hepatic and Extrahepatic Hepatitis C Virus Diseases and Impact of Interferon-Free HCV Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2020;10(4):a036921. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31636094/>
114. Hernáez-Alsina T, Caballol-Oliva B, Díaz-González Á, Guedes-Leal C, Reig M. Risk of recurrence of hepatocellular carcinoma in patients treated with interferon-free antivirals. Riesgo de recurrencia del carcinoma hepatocelular en pacientes tratados con antivirales libres de interferón. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019;42(8):502-511. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31472990/>
115. Huang CF, Yu ML. Unmet needs of chronic hepatitis C in the era of direct-acting antiviral therapy. *Clin Mol Hepatol* [Internet]. 2020;26(3):251-260. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32188235/>

116. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* [Internet]. 1994;19(6):1513-1520. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8188183/>

117. Guido M, Pizzi M, Sacerdoti D, Giacomelli L, Rugge M, Bolognesi M. Beyond scoring: a modern histological assessment of chronic hepatitis should include tissue angiogenesis. *Gut* [Internet]. 2014;63(8):1366-1367. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24444767/>

118. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* [Internet]. 1996;24(2):289-293. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/journal/15273350>

119. Wong VS, Wight DG, Palmer CR, Alexander GJ. Fibrosis and other histological features in chronic hepatitis C virus infection: a statistical model. *J Clin Pathol* [Internet]. 1996;49(6):465-469. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8763259/>

120. Petrescu F, Petrescu OI, Taisescu CI, Comănescu MV, Forțofoiu MC, Predescu IO, Roșu AF, Gheonea C, Biciușcă V. Histopathological aspects described in patients with chronic hepatitis C. *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2015;56(2):439-444. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26193211/>

121. Kukla M, Berdowska A, Gabriel A, Sawczyn T, Mazur W, Sobala-Szczygieł B, Grzonka D, Zajęcki W, Tomaszek K, Bułdak RJ, Zwirska-Korczala K. Association between hepatic angiogenesis and serum adipokine profile in non-obese chronic hepatitis C patients. *Pol J Pathol* [Internet]. 2011;62(4):218-228. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22246907/>

122. Castelo A, Mello CEB, Teixeira R, Madruga JVR, Reuter T, Pereira LMMB, Silva GF, Álvares-DA-Silva MR, Zambrini H, Ferreira PRA. Hepatitis C in the

Brazilian public health care system: burden of disease. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2018;55(4):329-337. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30785514/>

123. Wakamatsu A. *Hepatite C - Análise crítica da detecção de marcadores imuno-histoquímicos em comparação com parâmetros histológicos de gravidade de lesão* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.

124. Alves VAF. *Hepatite C crônica - Estudo de marcadores histológicos e imuno-histoquímicos do vírus e da resposta imune dos pacientes* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997

125. Mendes LS, Nita ME, Ono-Nita SK, Mello ES, da Silva LC, Alves VA, Carrilho FJ. Prognostic factors for progression of liver structural lesions in chronic hepatitis C patients. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008;14(16):2522-2528. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18442199/>

126. Patel K, Tillmann HL, Matta B, Sheridan MJ, Gardner SD, Shackel NA, McHutchison JG, Goodman ZD. Longitudinal assessment of hepatitis C fibrosis progression by collagen and smooth muscle actin morphometry in comparison to serum markers. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;43(3):356-363. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26560052/>

127. Gerber MA. Pathology of hepatitis C. *FEMS Microbiol Ver* [Internet]. 1994;14(3):205-210. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8086195/>

128. Mosnier JF. Current anatomico-pathological classification of hepatitis: characteristics of HCV infection. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 1996;11 Suppl 4:12-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8918744/>

129. Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative

analysis. *Hepatology* [Internet]. 1992;15(4):572-577. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1551632/>

130. Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. A review and update. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2000;113(1):40-55. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/113/1/40/1757595>

131. Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Majano PL, Moreno-Otero R. Integrins: structure, biological functions and relevance in viral chronic hepatitis. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 1995;25(2):71-78. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1995.tb01529.x>

132. Hassan G, Moreno S, Massimi M, Di Biagio P, Stefanini S. Interleukin-1-producing plasma cells in close contact with hepatocytes in patients with chronic active hepatitis. *J Hepatol* [Internet]. 1997;27(1):6-17. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80273-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80273-5)

133. Aizawa Y, Hokari A. Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects. *Clin Exp Gastroenterol* [Internet]. 2017;10:9-18. Published 2017 Jan 19. Disponível em: <https://www.dovepress.com/autoimmune-hepatitis-current-challenges-and-future-prospects-peer-reviewed-fulltext-article-CEG>

134. Paradis V, Mathurin P, Laurent A, Charlotte F, Vidaud M, Poynard T, Hoang C, Opolon P, Bedossa P. Histological features predictive of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *J Clin Pathol* [Internet]. 1996;49(12):998-1004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9038738/>

135. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Wai-Sun Wong V, Dufour JF, Schattenberg JM, Kawaguchi T, Arrese M, Valenti L, Shiha G, Tiribelli C, Yki-Järvinen H, Fan JG, Grønbaek H, Yilmaz Y, Cortez-Pinto H, Oliveira CP, Bedossa P, Adams LA, Zheng MH, Fouad Y, Chan WK, Mendez-Sanchez N, Ahn SH, Castera L, Bugianesi E, Ratziu V, George J. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver

disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* [Internet]. 2020;73(1):202-209. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>

136. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* [Internet]. 1999;116(6):1413-1419. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70506-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70506-8)

137. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* [Internet]. 2015;61(1):77-87. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.27259>

138. Mohd Hanafiah KM, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* [Internet]. 2013;57(4):1333-1342. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.26141>

139. Bouacida L, Suin V, Hutse V, Boudewijns M, Cartuyvels R, Debaisieux L, De Laere E, Hallin M, Hougardy N, Lagrou K, Oris E, Padalko E, Reynders M, Roussel G, Senterre JM, Stalpaert M, Ursi D, Vael C, Vaira D, Van Acker J, Verstrepen W, Van Gucht S, Kabamba B, Quoilin S, Muyltermans G. Distribution of HCV genotypes in Belgium from 2008 to 2015. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(12):e0207584. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0207584>

140. Zani C, Pasquale L, Bressanelli M, Puoti M, Paris B, Coccaglio R, Lascioli I, Pieriaci G, Donato F. The epidemiological pattern of chronic liver diseases in a community undergoing voluntary screening for hepatitis B and C. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2011;43(8):653-658. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1590865811001162?via%3Dihub>

141. Di Martino V, Crouzet J, Hillon P, Thévenot T, Minello A, Monnet E. Long-term outcome of chronic hepatitis C in a population-based cohort and impact of antiviral therapy: a propensity-adjusted analysis. *J Viral Hepat* [Internet]. 2011;18(7):493-505. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2893.2011.01476.x>

142. Brant LJ, Ramsay ME, Tweed E, Hale A, Hurrelle M, Klapper P, Ngui SL; Sentinel Surveillance of Hepatitis Testing Group. Planning for the healthcare burden of hepatitis C infection: Hepatitis C genotypes identified in England, 2002-2007. *J Clin Virol* [Internet]. 2010;48(2):115-119. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653210001344?via%3DiHub>

143. Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, Leandro G, Male PJ, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* [Internet]. 2004;53(3):406-412. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/53/3/406.long>

144. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malé PJ, Mentha G, Spahr L, Zarski JP, Borisch B, Hadengue A, Negro F. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* [Internet]. 2000;33(1):106-115. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882780080166X?via%3DiHub>

145. Amarapurkar AD, Amarapurkar DN, Vibhav S, Patel ND. Angiogenesis in chronic liver disease. *Ann Hepatol* [Internet]. 2007;6(3):170-173. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31924-6](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31924-6)

146. Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, Sakai T, Fujikawa K, Wagayama H, Takase K, Nakano T. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* [Internet]. 2001;32(12):1363-1370. Disponível

em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817701984771?via%3Di>
hub

147. Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* [Internet]. 2011;31(2):146-162. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1478-3231.2010.02369.x>

148. Fahey S, Dempsey E, Long A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2014;11(1):25-40. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cmi201337>

149. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* [Internet]. 2009;50(3):604-620. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.011>

150. Hano H, Takasaki S. Three-dimensional observations on the alterations of lobular architecture in chronic hepatitis with special reference to its angioarchitecture for a better understanding of the formal pathogenesis of liver cirrhosis. *Virchows Arch* [Internet]. 2003;443(5):655-663. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00428-003-0843-x>

151. Salcedo Mora X, Sanz-Cameno P, Medina J, Martín-Vílchez S, García-Buey L, Borque MJ, Moreno-Otero R. Association between angiogenesis soluble factors and disease progression markers in chronic hepatitis C patients. *Rev Esp Enferm Dig* [Internet]. 2005;97(10):699-706. Disponível em: <http://www.grupoaran.com/mrmUpdate/lecturaPDFfromXML.asp?IdArt=457570&TO=RRV&Eng=0>

152. Giatromanolaki A, Kotsiou S, Koukourakis MI, Sivridis E. Angiogenic factor expression in hepatic cirrhosis. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2007;2007:67187. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1847476/>

153. Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-kader O. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology* [Internet]. 2009;49(5):1469-1482. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.22849>

154. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Masaki T, Fukui H. Halting the interaction between vascular endothelial growth factor and its receptors attenuates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* [Internet]. 2004;39(6):1517-1524. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.20218>

155. Krasinskas AM, Goldsmith JD, Burke A, Furth EE. Abnormal intrahepatic portal vasculature in native and allograft liver biopsies: a comparative analysis. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2005;29(10):1382-1388. Disponível em: https://journals.lww.com/ajsp/Fulltext/2005/10000/Abnormal_Intrahepatic_Portal_VascuVascu_in_Native.16.aspx

156. Kuroda H, Abe T, Kakisaka K, Fujiwara Y, Yoshida Y, Miyasaka A, Ishida K, Ishida H, Sugai T, Takikawa Y. Visualizing the hepatic vascular architecture using superb microvascular imaging in patients with hepatitis C virus: A novel technique. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2016;22(26):6057-6064. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948259/>

157. Goulart E, de Caires-Junior LC, Telles-Silva KA, Araujo BHS, Rocco SA, Sforca M, de Sousa IL, Kobayashi GS, Musso CM, Assoni AF, Oliveira D, Caldini E, Raia S, Lelkes PI, Zatz M. 3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability in vitro. *Biofabrication* [Internet]. 2019;12(1):015010. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/ab4a30>

158. Caires-Júnior LC, Goulart E, Telles-Silva KA, Araujo BHS, Musso CM, Kobayashi G, Oliveira D, Assoni A, Carvalho VM, Ribeiro-Jr AF, Ishiba R, Braga KAO, Nepomuceno N, Caldini E, Rangel T, Raia S, Lelkes PI, Zatz M. Pre-coating decellularized liver with HepG2-conditioned medium improves hepatic recellularization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2021;121:111862. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493120337814?via%3Dihub>

159. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* [Internet]. 1994;94(5):2036-2044. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/117557>

160. Kane JM 3rd, Shears LL 2nd, Hierholzer C, Ambs S, Billiar TR, Posner MC. Chronic hepatitis C virus infection in humans: induction of hepatic nitric oxide synthase and proposed mechanisms for carcinogenesis. *J Clin Invest* [Internet]. 1994;94(5):2036-2044. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/117557>

161. Mihm S, Fayyazi A, Hartmann H, Ramadori G. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology* [Internet]. 1997;25(3):735-739. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.510250340>

162. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* [Internet]. 1998;101(11):2567-2578. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/1560>

163. Hassan MI, Kassim SK, Ali HS, Sayed el-DA, Khalifa A. Evaluation of nitric oxide (NO) levels in hepatitis C virus (HCV) infection: relationship to schistosomiasis and liver cirrhosis among Egyptian patients. *Dis Markers*

[Internet]. 2002;18(3):137-142. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3851405/>

164. Tsuji N, Ishiguro S, Sasaki Y, Kudo M. CD34 expression in noncancerous liver tissue predicts multicentric recurrence of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* [Internet]. 2013;31(5-6):467-471. Disponível em:
<https://www.karger.com/Article/FullText/355246>

165. Kaur S, Tripathi D, Dongre K, Garg V, Rooge S, Mukopadhyay A, Sakhuja P, Sarin SK. Increased number and function of endothelial progenitor cells stimulate angiogenesis by resident liver sinusoidal endothelial cells (SECs) in cirrhosis through paracrine factors. *J Hepatol* [Internet]. 2012;57(6):1193-1198. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.016>

166. Rautou PE. Endothelial progenitor cells in cirrhosis: the more, the merrier?. *J Hepatol* [Internet]. 2012;57(6):1163-1165. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827812006897?via%3Dihub>

167. Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2015;36(8):524-536. Disponível em:
[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165-6147\(15\)00091-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165-6147(15)00091-7)

168. Hoffman SJ, Psaltis PJ, Clark KJ, Spoon DB, Chue CD, Ekker SC, Simari RD. An in vivo method to quantify lymphangiogenesis in zebrafish. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(9):e45240. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045240>

169. Maby-El Hajjami H, Petrova TV. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2008;130(6):1063-1078. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00418-008-0525-5>

170. Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*. 2011;193(4):607-618. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/193/4/607/36662/Lymphatic-vascular-morphogenesis-in-development>

171. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* [Internet]. 2005;438(7070):946-953. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature04480>

172. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* [Internet]. 1997;276(5317):1423-1425. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/276/5317/1423.long>

173. Vollmar B, Wolf B, Siegmund S, Katsen AD, Menger MD. Lymph vessel expansion and function in the development of hepatic fibrosis and cirrhosis. *Am J Pathol*. 1997;151(1):169-175. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857941/>

174. Witte MH, Dumont AE, Cole WR, Witte CL, Kintner K. Lymph circulation in hepatic cirrhosis: effect of portacaval shunt. *Ann Intern Med* [Internet]. 1969;70(2):303-310. Disponível em: https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-70-2-303?url_ver=Z39.88-

175. Barrowman JA, Granger DN. Effects of experimental cirrhosis on splanchnic microvascular fluid and solute exchange in the rat. *Gastroenterology* [Internet]. 1984;87(1):165-172. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0016508584901409>

176. Aspestrand F, Schrumph E, Jacobsen M, Hanssen L, Endresen K. Increased lymphatic flow from the liver in different intra- and extrahepatic diseases

demonstrated by CT. *J Comput Assist Tomogr* [Internet]. 1991;15(4):550-554. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/2061465>

177. Martell M, Coll M, Ezkurdia N, Raurell I, Genescà J. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol* [Internet]. 2010;2(6):208-220. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v2/i6/208.htm>

178. Ribera J, Pauta M, Melgar-Lesmes P, Tugues S, Fernández-Varo G, Held KF, Soria G, Tudela R, Planas AM, Fernández-Hernando C, Arroyo V, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Increased nitric oxide production in lymphatic endothelial cells causes impairment of lymphatic drainage in cirrhotic rats. *Gut* [Internet]. 2013;62(1):138-145. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/62/1/138.long>

179. Bohlen HG, Gasheva OY, Zawieja DC. Nitric oxide formation by lymphatic bulb and valves is a major regulatory component of lymphatic pumping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1897-H1906. Disponível em: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00260.2011?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org

180. Atkinson M, Losowsky MS. The mechanism of ascites formation in chronic liver disease. *Q J Med* [Internet]. 1961;30:153-166. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.879.5057&rep=rep1&type=pdf>

181. Cárdenas A, Bataller R, Arroyo V. Mechanisms of ascites formation. *Clin Liver Dis* [Internet]. 2000;4(2):447-465. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089326105701185?via%3Dihub>

182. Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2001;55(2):122-145. Disponível em:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.1163>

183. Tugues S, Morales-Ruiz M, Fernandez-Varo G, Ros J, Arteta D, Muñoz-Luque J, Arroyo V, Rodés J, Jiménez W. Microarray analysis of endothelial differentially expressed genes in liver of cirrhotic rats. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1686-1695. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508505017907?via%3DiDih>

184. Yamauchi Y, Michitaka K, Onji M. Morphometric analysis of lymphatic and blood vessels in human chronic viral liver diseases. *Am J Pathol* [Internet]. 1998;153(4):1131-1137. Available