



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ROSIVANIA SILVA MOTA

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS PERIFÉRICAS E MEDULARES
EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C,
ASSINTOMÁTICOS DE DOENÇA HEPÁTICA.**

RECIFE – PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ROSIVANIA SILVA MOTA

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS PERIFÉRICAS E MEDULARES
EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C,
ASSINTOMÁTICOS DE DOENÇA HEPÁTICA.**

Dissertação de Mestrado apresentada à banca avaliadora do programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof.^aDr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

RECIFE – PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

M917a Mota, Rosivania Silva.
Alterações hematológicas periféricas e medulares em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, assintomáticos de doença hepática / Rosivania Silva Mota. – 2017.
106 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Medula óssea. 2. Hepatite C. 3. Carga viral. 4. Genótipo. 5. Fibrose hepática. I. Coelho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-272)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

ROSIVANIA SILVA MOTA

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS PERIFÉRICAS E MEDULARES EM
PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C, ASSINTOMÁTICOS
DE DOENÇA HEPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em: 30/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Maria da Conceição de Barros Correia (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Rejane Pereira Alves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

Dedico este trabalho ao grande arquiteto do Universo,
por ter me dado o dom da vida,
e a capacidade de lutar pelos meus objetivos;
aos meus pais Pedro (*in memoriam*) e Raimunda,
pelo amor e grande esforço para prover a minha educação;
aos meus amados filhos Raíssae Vítor,
por serem a inspiração maior da minha existência.
ao meu inestimável companheiro, Clérison Diniz,
que nesses 26 anos de união tem sido minha fortaleza em todos os momentos.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A realização deste estudo foi marcada por um caminho permeado de dificuldades e incertezas com momentos de muita angústia, mas também compreensão e companheirismo se fizeram presentes. Nessa trajetória muitas pessoas foram fundamentais, contribuindo com suas críticas construtivas, apoio e solidariedade. Desta forma, tentarei agradecer a algumas pessoas que contribuíram neste esforço coletivo e para as muitas outras que deveriam constar desta lista, sendo impossível citá-las nominalmente, fica registrado meus agradecimentos.

À Deus pela presença em todos momentos de minha vida, sempre me guiando e iluminando com seu Espírito, principalmente nos momentos mais difíceis, me permitindo chegar até aqui.

Aos meus pais, Pedro Pereira Mota (*in memoriam*) e Raimunda Silva Mota, que sempre me apoiaram em todas as etapas de minha vida pessoal e acadêmica, me dando confiança na minha capacidade de suplantar os obstáculos da minha jornada de vida.

Ao meu parceiro/ amante, Clérison Diniz, meu único e eterno amor, companheiro dos últimos 26 anos, que esteve presente em absolutamente todos os momentos de minha vida pessoal e acadêmica.

Aos meus filhos, Raíssa e Vitor, que me estimulam a querer sempre mais e enchem a minha vida de propósito e alegria, sem nunca reclamar de minhas longas ausências nos estudos e no trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Maria Rosângela, antes de mais nada, por acreditar em mim, por compartilhar sua sabedoria comigo, pela paciência e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários dos ambulatórios de hepatologia dos Hospitais Clementino Fraga, nas pessoas das enfermeiras Heloísa e Rosa Amélia e dos Hospitais Universitários Alcides Carneiro e Lauro Wanderley, em especial a Socorro, João e Márcia por me permitirem livre acesso nas instalações, ajudando-me sempre no que foi preciso.

Aos hepatologistas e infectologista dos Hospitais Clementino Fraga, Universitário Alcides Carneiro e Universitário Lauro Wanderley, Drs. Cláudia Gadelha, Erick Madruga, Francisco Bernardino, José Eymard Moraes, Gesira Florentino e em especial a Dra. Maria de

Fátima Duques, que me proporcionaram a concretização deste projeto na seleção dos pacientes, me permitindo ampla participação em vossos ambulatorios.

Ao Professor Gerson Bragagnoli, pela sua grande participação na análise estatística do trabalho, por me ensinar e se dispor com tanta paciência às minhas necessidades.

Ao Professor Carlos Brandt, grande mentor do projeto do Minter FCM – UFPE, que tornou possível a realização deste sonho.

A todos os funcionários da FCM e UFPE que estiveram dispostos sempre a ajudar, em especial a Walter, pois sem o seu apoio tudo seria ainda mais difícil.

Aos professores Maria Amélia Vieira Maciel, Maria da Conceição Barros e Líbia Cristina RochaVilela Moura pela disponibilidade em participarem da banca examinadora desta dissertação.

Aos meus colegas de Mestrado/MINTER, companheiros de estrada, Carlos Alberto, Maíra, Gustavo e Valéria, amigos de uma estrada esburacada, mas cheia de risadas e apoio mútuo, que hoje se encerra com sucesso. Estaremos sempre juntos, independente da distância!

Gostaria de agra

decir a todos que colaboraram direta e indiretamente para que fosse possível concluir mais este objetivo de minha vida. E principalmente aos clientes/”pacientes” que aceitaram participar desse estudo, assumindo um papel fundamental na construção desse conhecimento.

RESUMO

Existem muitos relatos de alterações hematológicas medulares em portadores crônicos do HCV, entretanto os estudos realizados até o momento se destinaram a pacientes infectados e sintomáticos de doença hepática e/ou hematológica que foram encaminhados a atendimento médico terciário para investigação de citopenias. Nenhum estudo foi encontrado que abordasse a avaliação das alterações em medula óssea, numa fase mais precoce da infecção, com pacientes ainda assintomáticos do ponto de vista hematológico e hepático. Os objetivos deste estudo foram descrever as alterações hematológicas periféricas e medulares em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) e assintomáticos de doenças hepática e hematológica, ainda não submetidos a tratamento específico e correlacioná-las com a carga viral plasmática, genótipos e graus de fibrose hepática. Estimar a frequência das alterações hematológicas periféricas e medulares e verificar a associação entre as alterações hematológicas periféricas e medulares com carga viral, genótipos e graus de fibrose hepática. Trata-se de estudo descritivo analítico, onde foram selecionados 30 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 a 60 anos, atendidos nos ambulatórios de hepatologia e infectologia do Estado da Paraíba no período de 01/2016 a 03/2017. Foi realizada uma entrevista para obtenção dos dados sócios demográficos, os clínico-laboratoriais foram obtidos a partir dos registros em prontuários e realizado a coleta do aspirado de medula óssea. A média de idade foi de 43,93, sendo 60,0% mulheres. A frequência das alterações hematológicas periféricas foi de 20,0% (6/30) e das alterações medulares de 90,0% (25/30), observou-se associação entre os indivíduos com alterações hematológicas periféricas e os graus de fibrose ($p=0,014$), sem associação com a carga viral e os genótipos. O genótipo 1 foi presente em 80,0% (24/30) dos pacientes e alta viremia em 64,4% (16/30) e 66,7% (20/30) com graus iniciais de fibrose hepática de F0 a F2. 80,0% (24/30) dos pacientes não tinham alterações no exame sanguíneo periférico, entretanto na análise do mielograma 56,7% (17/30) apresentavam algum tipo de alteração na celularidade geral e/ou específica por série, 83,3% (25/30) tinham alteração de maturação das linhagens celulares, predominando a desproporção maturativa núcleo citoplasmática e os retardos maturativos. Trata-se de estudo pioneiro com pacientes assintomáticos de doença hepática, infectados pelo HCV, assim apesar da baixa frequência das alterações periféricas, houve associação com os graus de fibrose e por outro lado as alterações hematológicas medulares foram altas, mas sem associação com a carga viral, os genótipos e o grau de fibrose, ressalta-se a importância do acompanhamento hematológico desses pacientes, uma vez que podem se beneficiar com uma abordagem mais precoce de sua doença hepática com o tratamento específico, bloqueando a progressão desses distúrbios hematológicos antes de tornarem-se irreversíveis.

Palavras-chave: Medula óssea. Hepatite C. Carga viral. Genótipo. Fibrose hepática.

ABSTRACT

There are many reports of hematological changes in peripheral blood and bone marrow in chronic HCV infected patients, however, the studies carried out so far have been aimed at patients infected and symptomatic of liver and / or hematological disease who were referred to tertiary medical care with cytopenias to be investigated. No study was found to address the evaluation of bone marrow changes, at an earlier stage of infection, with patients still asymptomatic from a hematological and hepatic point of view. The aims of this study were to describe hematological changes in peripheral blood and bone marrow in infected individuals with hepatitis C virus infection and asymptomatic of hepatic and hematological diseases, not yet submitted to specific treatment and correlate them with viral load, genotype and degree of hepatic fibrosis. To estimate the frequency of peripheral and medullary hematological changes and to verify the association between peripheral and medullary hematological changes with viral load, genotypes and degrees of hepatic fibrosis. This is an analytical descriptive study, in which 30 patients of both sexes, aged between 18 and 60 years old, attended at the outpatient clinics of hepatology and infectology of the State of Paraíba were selected from 2016, January to 2017, March. An interview was carried out to obtain the socio-demographic data, the clinical-laboratory ones were obtained from the medical records and the bone marrow aspirate was collected. The mean age was 43.93, with 60.0% women. The frequency of peripheral hematological alterations was 20.0% (6/30) and the medullary changes of 90.0% (25/30), an association was observed between individuals with peripheral hematological alterations and degree of fibrosis ($p=0,014$), without association with viral load and genotype. Genotype 1 was present in 80.0% (24/30) of the patients and high viremia in 64.4% (16/30) and 66.7% (20/30) with initial degrees of hepatic fibrosis from F0 to F2. 80.0% (24/30) of the patients had no alterations in the peripheral blood test; however, in the analysis of the myelogram 56.7% (17/30) presented some type of alteration in general and / or specific series cellularity, 83, 3% (25/30) had maturational alterations of the cell lineages, predominating maturative nucleus cytoplasmatic disproportion and maturative delays. This is a pioneer study with asymptomatic patients of liver disease, infected with HCV, thus, despite the low frequency of peripheral alterations was low, there was an association with the degree of fibrosis and, on the other hand, the hematological changes in bone marrow were high but with no association with viral load, genotype and degree of fibrosis, however the importance of hematologic follow-up of these patients is emphasized, since they may benefit from an earlier approach to their liver disease with specific treatment, blocking the progression of these hematological disorders before they become irreversible.

Keywords: Bone marrow. Hepatitis C. Viral load. Genotype. Hepatic fibrosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura morfológica do HCV.....	19
Figura 2: Estrutura Genética do vírus da hepatite C	20
Figura 3: Esquema do ciclo de replicação do HCV	21
Figura 4: Árvore filogenética de sequências do genoma completo do HCV, representando os 6 genótipos	24
Figura 5: Distribuição Mundial dos genótipos do HCV	24
Figura 6: Prevalência global estimada da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica no mundo	25
Figura 7: Prevalência da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica brasileira	27
Figura 8: Tempo de evolução da lesão hepática, em anos, após hepatite transfusional	29
Quadro 1– Variáveis dependentes	44
Quadro 2– Variáveis independentes	45
Figura 9: Agulha de aspirado medular tipo Rosenthal	48
Figura 10: Procedimento de coleta de aspirado medular em esterno	48
Figura 11: Fluxograma de atendimento dos paciente infectados pelo HCV para seleção da amostra	50
Figura 1: Distribuição das alterações periféricas em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes bioquímicos não invasivos no estadiamento da doença hepática viral e seus componentes	36
Tabela 1 – Distribuição dos dados sócios demográficos dos pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba.....	53
Tabela 2 – Frequência do genótipo, carga viral e grau de fibrose em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba	54
Tabela 3 – Distribuição das alterações medulares em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba	55
Tabela 4 – Associação das alterações periféricas com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba.....	56
Tabela 5 – Associação da celularidade medular com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba	57
Tabela 6 – Associação da maturação celular na medula com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCV	vírus da hepatite C, do inglês <i>hepatitis C virus</i>
HIV	vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>humanimmunodeficiencyvirus</i>
HAV	vírus da hepatite A, do inglês <i>hepatitisAvirus</i>
HBV	vírus da hepatite B, do inglês <i>hepatitisBvirus</i>
MELD	escore para doença hepática avançada, do inglês <i>Model For End-StageLiverDisease</i>
RNA – HCV	ácidoribonucleico do vírus da hepatite C, do inglês <i>ribonucleicacidofhepatitis C virus</i>
HVR	região de hipervariabilidade genética, do inglês <i>hypervariableregions</i>
DNA	ácidodesoxirribonúcleico, do inglês <i>desoxiribonucleicacid</i>
cDNA	ácidodesoxirribonúcleico complementar, do inglês <i>complementarydesoxiribonucleicacid</i>
ELISA	teste de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>enzyme-linkedimmunosorbentassay</i>
NS	proteína não-estrutural, do inglês <i>non structural</i>
LDL	lipoproteínas de baixa densidade, do inglês <i>LowDensityLipoproteins</i>
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade, do inglês <i>VeryLowDensityLipoproteins</i>
RE	retículo endoplasmático
CG	complexo de Golgi
NTR	regiões terminais não traduzidas, do inglês <i>untranslatedregion</i>
IRES	sítio interno de entrada de ribossomo, do inglês <i>internalribosomeentry site</i>
ANTI-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C, do inglês <i>hepatitis C virus antibody</i>
OMS	OMS – Organização Mundial de saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
AST	aspartatoaminotransferase
ALT	alaninaaminotransferase
RIBA	testeimmunoblot recombinante, do inglês <i>recombinantimmunoblotassay</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polimerase chainreaction</i>

bDNA	ácido desoxirribonucleico ramificado, <i>brancheddesoxiribonucleicacid</i>
NAT	técnica de amplificação de ácido nucléico, do inglês <i>nucleicacidamplificationtechnology</i>
IFN	interferon
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano, do inglês <i>human T lymphotropic virus</i>
LMA	Leucemia mielóide aguda
MM	Mieloma múltiplo
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
SMD	Síndrome Mielodisplásica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	A hepatite C no mundo e no Brasil	18
2.2	Características do vírus da hepatite C e sua replicação	19
2.3	Transmissão.....	22
2.4	Epidemiologia e Fatores de risco	23
2.5	História natural da progressão da infecção crônica pelo HCV	28
2.6	Diagnóstico da infecção crônica pelo HCV	30
2.7	Fatores correlacionados a lesão hepática pelo HCV	32
2.8	Métodos não invasivos de avaliação da fibrose hepática	35
2.9	Infecção extra-hepática pelo HCV: sistema hematopoiético.....	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	METODOLOGIA	43
4.1	Desenho do estudo	43
4.2	População da pesquisa	43
4.3	Critérios de inclusão	43
4.4	Critérios de exclusão	43
4.5	Definição e categorização das variáveis	44
4.6	Tipo de amostragem	47
4.7	Exames laboratoriais	47
4.8	Coleta de medula óssea	47
4.9	Métodos não invasivos para avaliação da fibrose hepática	48
4.10	Considerações éticas	49
4.11	Análise estatística.....	49

4.12	Fluxograma de atendimento ambulatorial	49
5	RESULTADOS	51
	Alterações hematológicas periféricas e medulares em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, assintomáticos de doença hepática.	
6	CONCLUSÕES	62
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICES.....	74
	Apêndice A – Instrumento de coleta de dados.....	74
	Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77
	Apêndice C – Artigo científico.....	80
	Apêndice D – Scientific article.....	93
	ANEXO	106
	Anexo A – Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	106

1 INTRODUÇÃO

Pesquisastêm descrito alterações hematológicas periféricas e medulares associadas à hepatite C (DIETERICH; SPIVAK, 2003; KLCO et al., 2010; ASFOUR et al., 2013).Elas se desenvolvem tanto por agressão viral direta, quanto pela resposta imune crônica do organismo, expressando-se comumente como citopenias no sangue periférico(STREIFF; MEHTA; THOMAS, 2002) e alterações diversas em medula óssea, tais como aplasia, displasia, siderose, hipo e hiperplasmias total ou setorial(DIETERICH; SPIVAK, 2003; ASFOUR et al., 2013)

Um estudo realizado com pacientes monoinfectados pelo vírus da hepatite C (HCV), submetidos à biópsia de medula óssea devido à presença de alguma citopenia, demonstrou alterações em medula ósseaem correlação com o uso de antivirais, sugerindoque a disfunção medular é independente do estágio ou da extensão da fibrose hepática(KLCO et al., 2010). Além disso, BELLENTANI (1999) e MOATTER (2002) mostraram que o genótipo 1b é o maior fator de risco associado à presença de cirrose e/ou de carcinoma hepatocelular(BELLENTANI et al., 1999; MOATTER et al., 2002). No entanto não existem pesquisas que permitam estender essa mesma relação às alterações em medula óssea em pacientes assintomáticos de doença hepática.

Foram encontradas alterações celulares em medula óssea de pacientes com RNA-HCV intramedular, comparando-os com pacientessem RNA-HCV na medula óssea, porém não houve correlação com genótipos e carga viral. Entretanto os pacientes já apresentavam alterações hematológicas periféricas (ABOU EL AZM et al., 2012).

ANWAR et al., (2012) também descreveram alterações em medula óssea de pacientes com hepatite C crônica, onde 100% dos pacientes apresentavam alterações hematológicas periféricas importantese doença hepática avançada, não tendo sido avaliadosinfectados assintomáticos quanto as doenças hepática e hematológica.

Esses estudos foram realizados em pacientes já com doença hepática avançada sintomática e com alterações hematológicas periféricas importantes, onde se esperariam alterações hematológicas medulares mais severas e irreversíveis, multifatoriais. Não tendo sido estabelecida correlação das alterações intramedulares com a carga viral plasmática e os genótipos em pacientes assintomáticos.

As alterações hematológicas podem influenciar na adesão do próprio paciente pelos efeitos colaterais, bem como pela contra-indicação médica ao tratamento, portanto no tratamento para hepatite C, comprometendo seu prognóstico. Assim, a detecção precoce de

alterações medulares poderá auxiliar no tratamento eficaz da hepatite C, sem reduções de dosagem e nem descontinuação dos esquemas em administração, podendo lentificá-las/ou compensá-las com o uso de fatores estimulantes de crescimento de colônias, todavia a sua eficácia depende do prévio conhecimento da celularidade e da normopoiesemedulares(DIETERICH; SPIVAK, 2003)

Diante do exposto, esse estudo descreveu as alterações hematológicas periféricas e medulares, em indivíduos infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática, sem tratamento específico associando com genótipo, carga viral e grau de fibrose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da hepatite C

A hepatite C, anteriormente conhecida como hepatite não-A não-B, é uma das infecções virais mais frequentes na humanidade, superando a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e da imunodeficiência humana adquirida (RUSTGI, 2007). A hepatite C vem sendo estudada há vários anos, mesmo antes da descoberta do vírus causador da doença - o HCV - em 1989. Na década de 70 foi detectada a ocorrência de hepatite pós-transfusional em cerca de 10% dos pacientes que tinham recebido algum hemocomponente, posteriormente, na década de 80 passando a responder por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não-A e não-B. Sendo que nestes pacientes não se detectava marcadores virais para as já conhecidas hepatites A e B, sugeriu-se, então, a existência de um terceiro vírus para explicar estes casos, mas este parecia escapar aos métodos investigacionais empregados até então (FEINSTONE; KAPIKIAN; PURCELL, 1973). Já no início dessa década, estudos experimentais em primatas e desenvolvidos no Centro de Controle de Atlanta -EUA, revelaram a presença de um agente infeccioso com 60nm de diâmetro, revestido de um invólucro lipoprotéico, genoma constituído de ácido ribonucleico (RNA), classificado inicialmente como pertencente à família *Togaviridae* e transmissível mediante sangue e hemoderivados. Denominado por Daniel Bradley e colaboradores de agente de forma tubular (BRADLEY et al., 1985).

Somente em 1989, Qui-Lim-Choo, George Kuo, Daniel Bradley e Michael Houghton após seis anos de intensa investigação (1982-1988) obtiveram um clone do genoma viral de uma partícula de DNA complementar (cDNA) do plasma de chimpanzés infectados com soro humano contaminado com o vírus da hepatite não-A e não-B. Este patógeno passou a ser conhecido como HCV. A partir desta descoberta, não levou muito tempo para que fossem desenvolvidos os primeiros testes capazes de detectar anticorpos contra o HCV (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*). Com a subsequente implantação destes testes em bancos de sangue, os casos da até então denominada hepatite não-A, não-B, pós-transfusional vem diminuindo progressivamente (DONAHUE et al., 1992).

Apesar dos enormes esforços científicos desde sua descoberta, o cultivo do vírus só se tornou possível há poucos anos, e apenas para um genoma único (JFH1), obtido de um paciente com hepatite aguda fulminante no Japão (KATO, 2001). A maior parte do conhecimento sobre o HCV é proveniente de sistemas replicativos *in vitro* (replicons), capazes de proporcionar a replicação genômica e sub-genômica e expressão protéica (LOHMANN et al., 1999; BARTENSCHLAGER; KAUL; SPARACIO, 2003; BLIGHT et al., 2003).

2.2 Características do vírus da hepatite C e replicação

O HCV pertence filogeneticamente à ordem *Nidovirales*, à família *Flaviviridae*, subfamília *Flavivirinae*, ao gênero *Hepacivirus* e espécie vírus da hepatite C (VAN REGENMORTEL et al., 2000; LEVINSON & JAWETZ, 2005; ICTV, 2014). É um vírus de RNA, envelopado, de genoma com fita simples de polaridade positiva medindo 9,7 kilobases de comprimento (Figura 1).

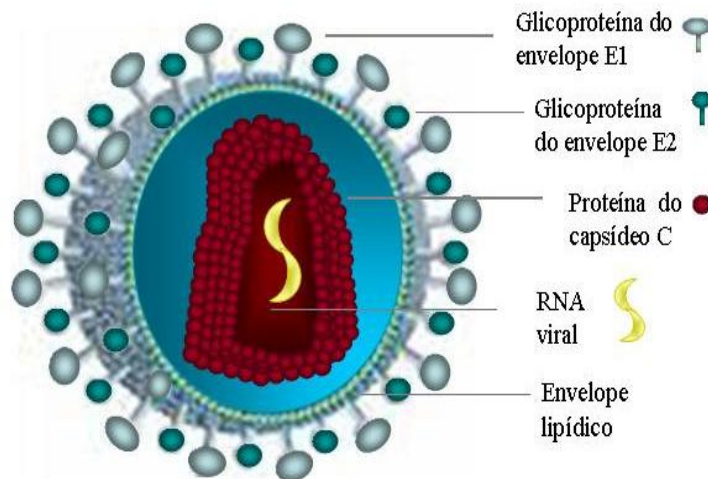


Figura 1: Estrutura morfológica do HCV

Fonte: Adaptado de PHYSICIANS' RESEARCH NETWORK <[http:// www.prn.org/](http://www.prn.org/)>.

Apresenta genoma com duas regiões não-codificadoras em suas extremidades, sendo sua porção codificante geradora, em matriz aberta de leitura, de uma poliproteína de 3010 a 3033 aminoácidos (dependendo do genótipo), que sob ação auto proteolítica e proteolítica da célula hospedeira (hepatócito), origina proteínas estruturais (C, E1, E2 - onde a região E2/NS1 representa a região de hipervariabilidade genética: HVR1 e HVR2) e não-estruturais (NS-2, p7, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5A, NS-5B), essas últimas responsáveis pela replicação viral (LOHMANN et al., 1999; PENIN et al., 2004). Outras proteínas não estruturais (NS) incluem, entre outras, protease, helicase e RNA polimerase (Figura 2). Através da análise filogenética de cepas do HCV, atualmente foram identificados em várias regiões do mundo seis tipos principais de genótipos, enumerados de 1 a 6.

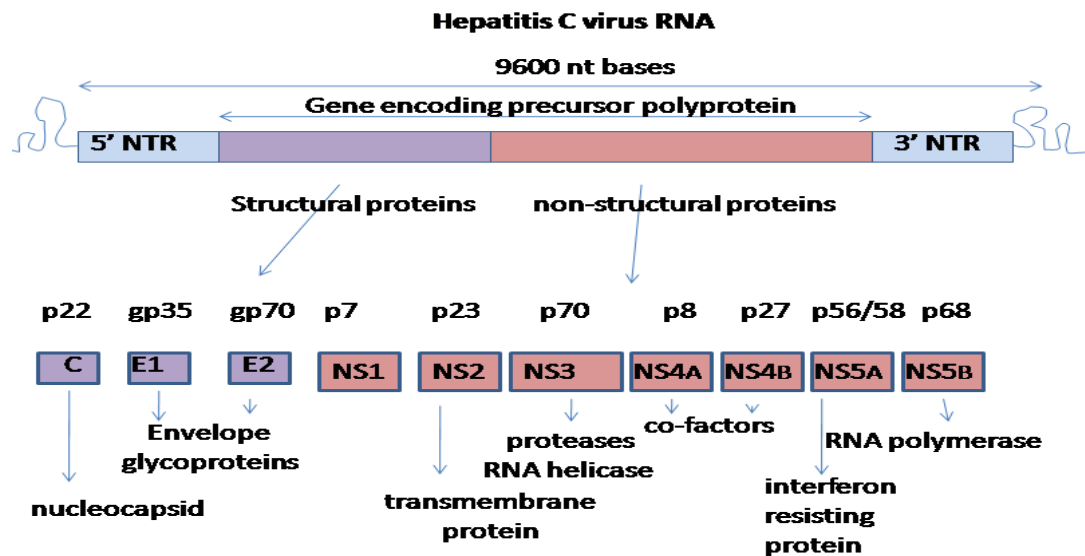


Figura 2: Estrutura genética do vírus da hepatite C
 Fonte: Adaptada de ANZOLA & BURGOS, 2003.

Como o HCV ainda não foi cultivado em células, o mecanismo de replicação do HCV ainda está pouco esclarecido, sendo que o modelo aceito é aquele baseado na similaridade do ciclo dos demais vírus pertencentes à família Flaviviridae. O vírus invade, infecta e replica-se na corrente sanguínea, repetindo o mesmo processo em vários tecidos, assim como nos linfócitos B e T periféricos e células mononucleares, enquanto se direciona por tropismo natural ao fígado, onde infecta aproximadamente 10% das suas células (DUSTIN; RICE, 2007). Nesse trajeto para os hepatócitos, o vírus passa por diversos órgãos tais como o pâncreas, tireóide, glândulas adrenais, baço e medula óssea, locais onde podem se desenvolver variantes virais que agem como reservatórios para o vírus, tendo importante papel na persistência e reativação viral (ZIGNEGO et al., 2007). A replicação inicia com a adsorção da partícula viral à membrana celular, para que esta penetre na célula por fusão de membrana (endocitose) mediada por receptor CD81 (PAWLOTSKY, 2004; PENIN et al., 2004). Esse processo de penetração do vírus é facilitado pela via lipoproteína de baixa densidade (LDL e VLDL) como receptores que se ligam ao complexo E1 e E2 expressos na superfície do HCV (SZABÓ et al., 2003; PAWLOTSKY, 2004; VISO, 2007) (Figura 3).

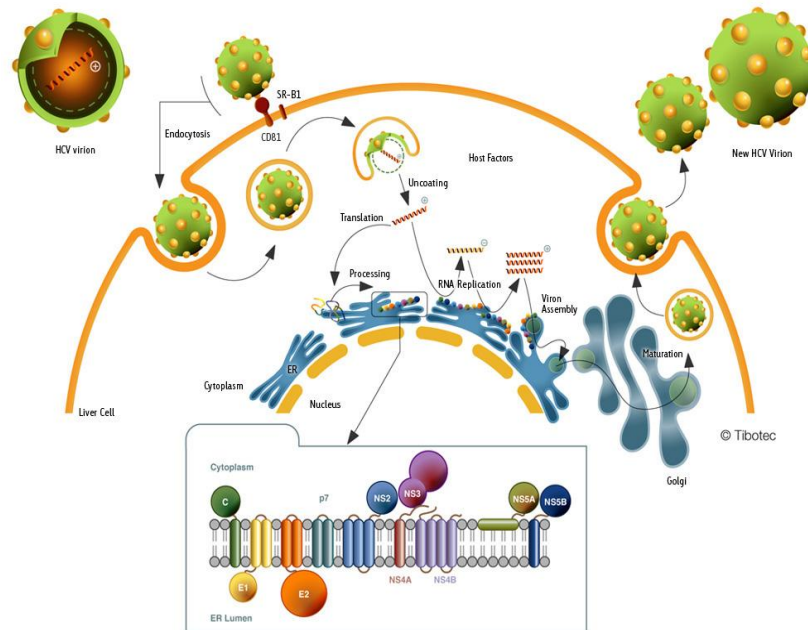


Figura 3: Esquema do ciclo de replicação do HCV

Fonte: Adaptada de <http://www.tibotec.com>

Segundo o modelo proposto por BARTENSCHLAGER & LOHMANN (2000), a ligação da partícula viral à célula hospedeira requer a interação da proteína E2 ou do complexo E1/E2 com um receptor presente na superfície da célula, o CD81 (POLYAK et al., 2001), um outro estudo mostra ainda que esta interação é essencial no processo de entrada do vírus (LINDENBACH et al., 2005). Acredita-se que desde que a expressão do CD81 não é restrita apenas aos hepatócitos ou às células do sangue periférico, um segundo receptor ou co-receptor pode ser requerido (BARTENSCHLAGER; LOHMANN, 2000).

Após a penetração, o vírus sofre desnudamento, expondo o genoma viral, para assim iniciar a replicação bioquímica. A atividade de RNA-polimerase RNA-dependente (transcriptase) gera uma fita de RNA, de polaridade negativa, complementar ao RNA viral, que serve também de molde para que haja a síntese de novas fitas de RNA de polaridade positiva que servirão para a formação de novos vírus (PAWLOTSKY, 2004; PENIN et al., 2004).

O RNA de polaridade positiva sintetizado interage com múltiplas cópias da proteína do capsídeo para formar o nucleocapsídeo viral, o qual adquire o envelope no retículo endoplasmático (RE). Após a partícula viral montada, esta é transportada, via complexo de Golgi (CG), para ser eliminada da célula hospedeira (PAWLOTSKY, 2004). O RNA viral serve como mRNA e depois da tradução, uma poliproteína é produzida e clivada em proteínas estruturais e não-estruturais (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002; SZABÓ et al., 2003).

As regiões terminais não traduzidas (NTR) são essenciais no processo de replicação viral. Em particular, a região 5' NTR, na qual se encontra a sequência mais conservada do genoma do HCV, esta contém um sítio interno de entrada de ribossomo (IRES) essencial para a tradução independente do RNA viral (KATO, 2001).

A região 3' NTR é constituída de uma estrutura em forma de trevo, consistindo de uma região variável pequena de aproximadamente 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, sendo, assim como a região 5' NTR, fundamental na replicação viral (LINDENBACH et al., 2005). A taxa de replicação viral é alta, de aproximadamente 1×10^{12} virions por dia, com tempo de incubação bastante variável de 1 a 13 meses.

2.3 Transmissão

O tempo de incubação da hepatite C mostra-se bastante variável, com média de 8 meses. Como as formas anictéricas da hepatite C correspondem a cerca de 70% dos casos, os indivíduos contaminados evoluem para a cronicidade, totalmente assintomáticos, sem terem conhecimento da presença do anti-HCV ou mesmo do aumento de enzimas hepáticas, como a ALT. Nessa fase de janela imunológica, ou seja, de presença do RNA-HCV ainda com anticorpos negativos pode ocorrer contaminação parenteral, tanto por transfusão sanguínea como pelo uso de drogas ilícitas e outros, sendo essa a principal forma de transmissão viral (ZIBBELL et al., 2009; STOCKMAN et al., 2014).

Os diversos estudos já realizados demonstraram que o VHC é o agente causal de mais de 90% das hepatites pós-transfusionais. No Brasil, a partir de 1993, há a obrigatoriedade dos testes sorológicos (anti-HCV) em candidatos a doação de sangue, diminuindo o número de casos de infecção pelo HCV durante as transfusões sanguíneas e de hemoderivados. Além dos produtos do sangue, agulhas/seringas contaminadas ou mesmo a inalação de drogas — com o uso de espelhos e canudos contaminados — passando a ser a principal via de risco para a infecção pelo HCV (ANVISA, 1993; ANVISA, 2003; WILLIAMS et al., 2011). Globalmente, estima-se que 64% dos usuários de drogas injetáveis (UDI) estão infectados pelo HCV (WARD, 2013).

Outras formas parenterais de contaminação são os procedimentos médicos, odontológicos, de acupunturista ou de tatuagem. Portanto, qualquer material cortante ou perfurante pode ser veículo transmissor do vírus de uma para outra pessoa, como o alicate da manicure, a lâmina do barbeiro ou mesmo a escova de dente, compartilhada por cônjuges

ou filhos. Também há uma porcentagem significativa de pacientes com antecedentes de cirurgias prévias e/ou atendimentos médicos de urgência em prontos-socorros ou ainda a hipótese já confirmada de contaminação médica durante o ato cirúrgico(FOCACCIA; SOUZA, 2005; ALTER, 2007; WARD, 2013).

Dentre as formas não-parenterais de transmissão da hepatite C torna-se importante ressaltar a possibilidade da transmissão sexual, entretanto essa tem sido uma via de baixa prevalência nos muitos estudos realizados até o momento (ALTER, 2007; ZIBBELL et al., 2009; STOCKMAN et al., 2014) que descrevem uma frequência de 15% a 20%(CRAXI, 2011). Quanto à transmissão vertical, mães coinfectadas foram 3,8 vezes mais propensas a transmitir o HCV ao filho. O aleitamento materno parece não contribuir de modo importante para a transmissão do HCV. As taxas de transmissão vertical do HCV variam entre 0% a 20%, com média em torno de 5% na maioria dos estudos(GIBB et al., 2000; TAJIRI et al., 2001) (Os fatores de risco para transmissão vertical incluem elevada carga viral da mãe, trabalho de parto prolongado, monitoração fetal interna e coinfeção HIV-HCV(ROBERTS; YEUNG, 2002).

2.4 Epidemiologia e fatores de risco

A elevada taxa de mutação do HCV ($1,44$ a $1,92 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos/local no genoma/ano) determina a classificação do vírus em grupos filogenéticos (ZARIFE *et al.*, 2006). A análise filogenética de cepas do HCV, seja de toda a sequência ou parcial, isoladas em várias regiões do mundo, levou a identificação de genótipos do HCV, incluindo seis tipos principais, enumerados de 1 a 6, sendo o genótipo 1 o mais prevalente em todo o mundo (40% a 80%), além dos seis genótipos há um grande número de subgrupos dentro destes grupos, chamados subtipos e identificados por letras minúsculas (1a, 1b, etc.). Atualmente são mais de 100 subtipos conhecidos. Os tipos diferem de 31% a 34% em suas sequências de nucleotídeos e aproximadamente 30% em suas sequências de aminoácidos, enquanto os subtipos diferem em 20% a 23% de suas sequências de 3 nucleotídeos, com importante diferença conforme a região genômica (SIMMONDS et al., 2005). Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ainda ter variações do HCV, que são denominadas quasispecies. Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações. Esta multiplicidade de padrões de organização genética representa um dos maiores desafios para o tratamento, bem como para a elaboração de uma vacina (Figura 4).

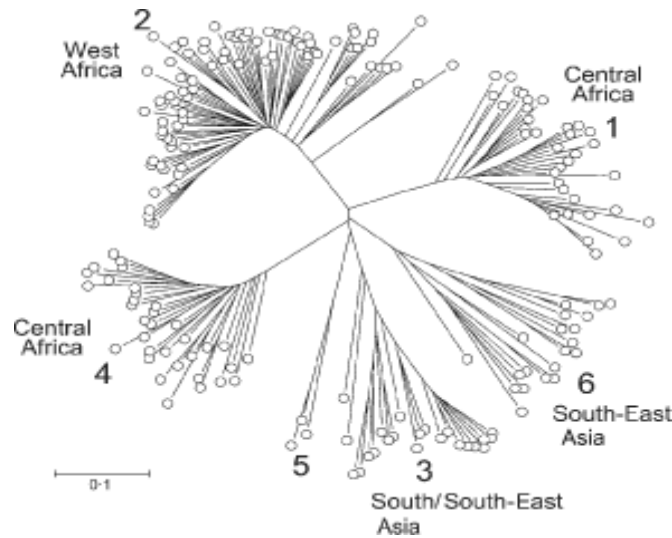


Figura 4: Árvore filogenética de sequências do genoma completo do HCV representando os 6 genótipos .
Fonte: SIMMONDS, 2005.

O subtipo 1a é o mais prevalente nos EUA, seguido do subtipo 1b, que também predomina na Europa, na Turquia, no Japão e em Taiwan. O genótipo 2 tem distribuição universal com frequência de 10% a 40%, enquanto o genótipo 3 predomina no noroeste da Índia, no Paquistão, na Escócia, na Austrália e nos países da América do Sul. O genótipo 4 é prevalente no Oriente Médio e na África Central, o genótipo 5, no sul África, e o genótipo 6, no sudoeste da Ásia. Já no Brasil, o genótipo 1, subtipo b, é o mais prevalente (64,9%), seguido do genótipo 3 com 30,2%. O genótipo 1 está associado à pior resposta ao tratamento antiviral do que os genótipos 2 e 3 (CAMPIOTTO et al., 2005) (Figura 5).

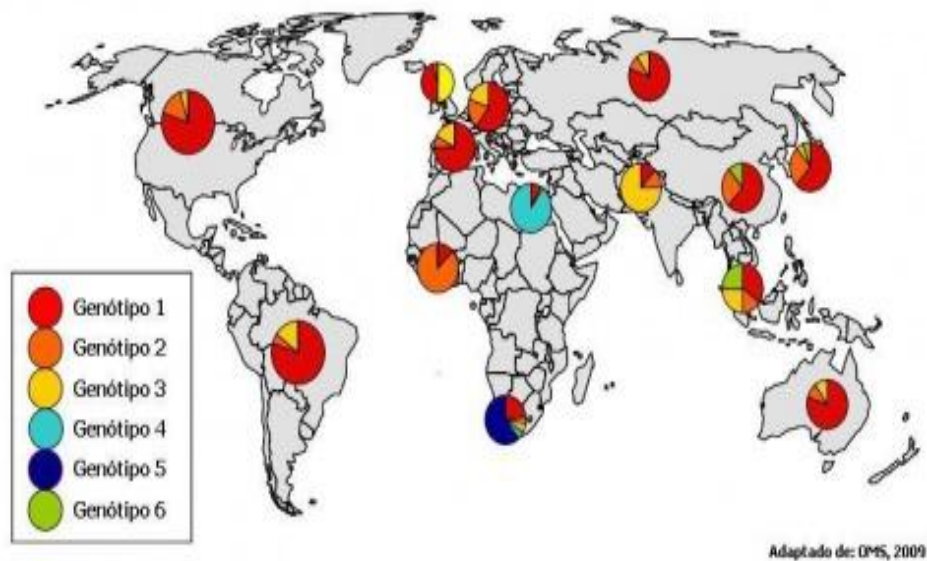


Figura 5: Distribuição Mundial dos genótipos do HCV
Fonte: adaptado de OMS, 2009

Estudos apontam que sua prevalência vem decaindo nos últimos anos, entretanto há uma grande variação na prevalência da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica estudada, refletindo não só características epidemiológicas distintas entre as populações, mas diferenças nas metodologias utilizadas para a realização das estimativas.

Segundo a OMS (2007), a despeito dessas estimativas populacionais variadas, estudos apontam para uma prevalência global em torno de 2% a 3%, ou seja, entre 123 milhões e 170 milhões de pessoas infectadas pelo HCV em todo o mundo, com cerca de 4 a 6 milhões de novos infectados a cada ano (Figura 6).

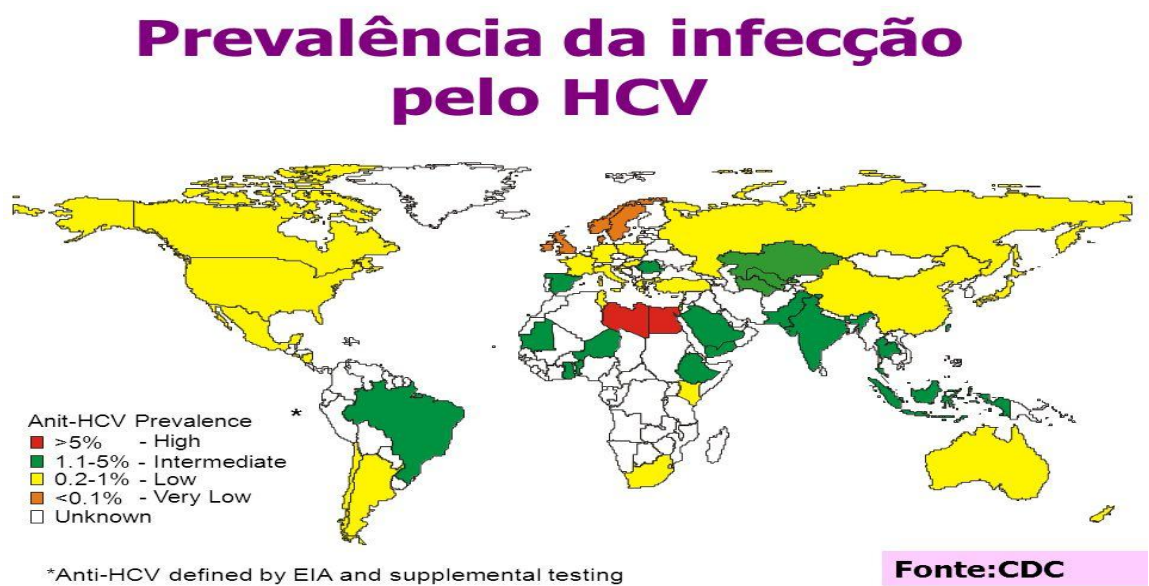


Figura 6: Prevalência global estimada da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica no mundo
Fonte: adaptado de CDC, 2008.

A prevalência da infecção pelo HCV é considerada baixa no Reino Unido, Escandinávia (0,01% a 0,1%), Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul (0,2% a 0,5%)⁸. Prevalências intermediárias são encontradas no Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. Outros países com prevalência intermediária incluem Brasil, Europa Oriental, partes da África e Ásia. O Egito possui alta prevalência de infecção pelo HCV (17% a 26%), além de Hubei, Mongólia, Paquistão (PERZ et al., 2004; ALTER, 2007).

O Brasil é um país de proporções continentais e, portanto, com grandes variações demográficas, sociais e culturais entre as diferentes regiões. Por esse motivo, os estudos que avaliam a prevalência do HCV no Brasil são escassos e pouco precisos, englobando, no geral, áreas geográficas restritas ou populações específicas, como os doadores de

sangue(FERREIRA; SILVEIRA, 2004; MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011).

Um inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia conjuntamente com o Ministério da Saúde nas capitais brasileiras revelou que apenas 16% da população total do país já tinha sido testada para hepatite C, revelando que a maior parte dos infectados pelo vírus ainda não foi diagnosticada (MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SBH, 2011). Segundo estimativas oficiais de prevalência de hepatite C no Brasil, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas seriam reagentes para o anti-HCV(PEREIRA et al., 2010). No entanto, a utilização de um grupo específico como os doadores de sangue limita a extrapolação dessas estimativas para a população geral.

Em outro estudo de base populacional publicado por FOCACCIA et al.(1998),relatou-se prevalência de 1,42% de positividade para o anti-HCV em 1049 residentes do município de São Paulo. As maiores prevalências foram observadas nos indivíduos acima de 30 anos, sendo o pico de 3,8% observado na faixa etária entre 50 e 59 anos. A maior prevalência de hepatite C observada após os 50 anos de idade sugere infecção em um passado distante, sendo possível um deslocamento gradual entre as faixas etárias, com tendência de a maioria dos casos se concentrar entre os idosos(FOCACCIA et al., 1998). Dados esse corroborados por outro estudo posterior, com o propósito de determinar a associação entre a idade do diagnóstico e o grau de lesão hepática pelo HCV, concluindo que a idade ao diagnóstico da infecção pelo HCV correlaciona-se significativamente com a fibrose ($rs=0.307$, $p<0.001$) e que a mesma aumenta com a idade avançada((DE OLIVEIRA et al., 2014).

Posteriormente, outro estudo de base populacional publicado pelo Ministério da Saúde e pela Organização Pan-americana de Saúde e realizado nas capitais das cinco macrorregiões brasileiras, relatou prevalência global de 1,38%. Nesse estudo, na análise por faixa etária o percentual de expostos ao HCV na faixa de 10 a 19 anos foi de 0,75%, com maior pico de 1,56% na faixa etária de 20 a 69 anos. Os principais grupos de risco foram os usuários de drogas (27,4%) e hemotransfundidos (26,9%) e na análise da raça 68,1% eram brancos. A razão homens e mulheres foi de 1,4 (PEREIRA et al., 2010).

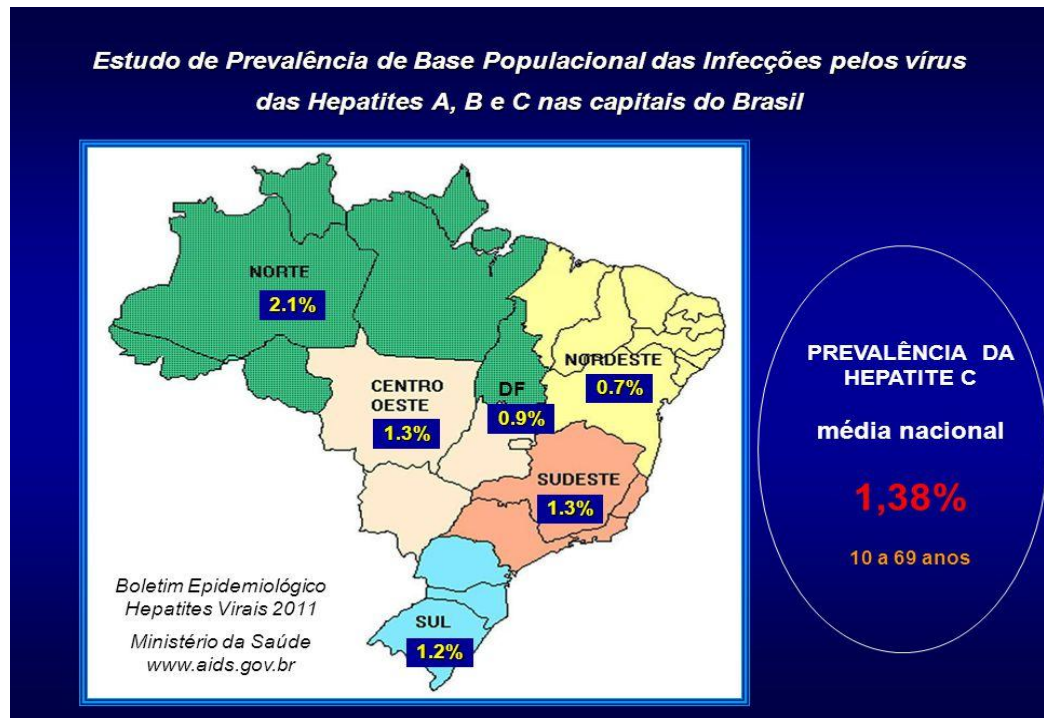


Figura 7: Prevalência da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica brasileira
Fonte: adaptado de BRASIL, 2011.

Do total de casos de hepatite C registrados entre 1999 e 2011 e divulgados no Boletim Epidemiológico das hepatites virais em 2012, 55.222 foram na região Sudeste e 18.307, na Sul. Juntas, essas duas regiões concentraram 90% dos casos confirmados no país. As taxas de incidência mais elevadas também se concentraram nessas regiões. Enquanto o país registrou incidência de 5,4 casos confirmados para hepatite C, em 2010, a região Sudeste apresentou 8,1 e a Sul, 9,4. Nesse boletim as duas principais vias de transmissão são uso de drogas e transfusão de sangue. Em 2011, o uso de drogas como provável fonte de infecção foi registrado em 28,9% dos casos e a transmissão por transfusão em 25,2% (BRASIL, 2012).

A infecção pelo vírus da hepatite C tem forma de transmissão predominantemente parenteral. A investigação dos fatores de risco para infecção pelo HCV realizada por estudos prospectivos e retrospectivos apontam como principais fatores de risco: transfusão de sangue e hemoderivados de doadores não testados para anti-HCV; transplantes de órgãos de doadores infectados; uso de drogas injetáveis; terapias injetáveis com equipamento contaminado (ou não seguro); tatuagens e piercings; hemodiálise; exposição ocupacional ao sangue; transmissão perinatal e transmissão sexual. Entre os diversos fatores de risco, os mais descritos na literatura são a transfusão sanguínea, uso de drogas injetáveis e terapias invasivas com equipamentos contaminados (ALTER, 2002; BRASIL, 2012). Já o risco de transmissão de hepatite C por via sexual é extremamente baixo, estimando-se aproximadamente 0,1% ao ano a transmissão entre casais monogâmicos (VANDELLI et al., 2004).

Em publicação mais recente, o Ministério da Saúde aponta que a ocorrência de hepatite C entre os anos de 2004 a 2014, notificados por ano no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), não apresentou alteração significativa nesse período, à exceção do ano de 2013, com aumento de aproximadamente 49% em relação ao número médio de casos notificados entre 2004 e 2014 (BRASIL, 2015).

Como no caso da hepatite B, a transmissão da hepatite C está relativamente estável no Brasil, em termos de número de casos novos diagnosticados por ano, nesse período de 10 anos, à exceção de 2013. Também não houve variação significativa na distribuição etária e por sexo dos casos novos diagnosticados em cada ano no mesmo período. As regiões Sudeste e Sul concentram 86% dos casos notificados de hepatite C no Brasil, sendo a Região Sudeste responsável por 60% dos casos. Nessa região a distribuição dos potenciais fatores de riscos para a hepatite C mostrou uma maior prevalência de transfusão sanguínea, tatuagens e uso de droga inalada quando comparada as demais regiões. De acordo com a prevalência real esperada, estimada pelo modelo dinâmico para o Brasil, a prevalência total esperada de hepatite C no Brasil era de aproximadamente 1.450.000 casos em 2014 (BRASIL, 2015).

O número de mortes anuais por cirrose ou hepatocarcinoma relacionadas a infecção pelo HCV poderá chegar a ser superior às mortes causadas pelo HIV (NIH, 2002).

2.5 História natural da progressão da infecção pelo HCV

A hepatite C crônica é a principal doença causada pelo HCV, só tendo sido identificada há 28 anos, nesse curto período vem experimentando uma rápida evolução dos conhecimentos científicos, desde a descoberta até a cura. Entretanto, mais de vinte anos após a descoberta do HCV, o conhecimento sobre a história natural da hepatite C permanece ainda limitado, mas é claro e bem observado que a doença tem progressão lenta, sendo necessários vários anos para evoluir à fibrose hepática significativa. A partir do momento que o vírus se dissemina em um organismo, a sua distribuição entre e dentro dos tecidos do hospedeiro torna-se um fator determinante da sua patogênese. No entanto, a distribuição do vírus pelos tecidos é um processo dinâmico determinado por diversos fatores, que incluem a velocidade de replicação viral, a presença de receptores virais específicos, a taxa de mutação viral, a susceptibilidade hospedeira e genes de resistência, e a imunidade inata e adaptativa (KNIPE; HOWLEY; ROIZMAN, 2013). Essa difícil determinação da história natural da hepatite C é devida a vários fatores: escassez de estudos prospectivos, frequente imprecisão dos dados sobre a época da contaminação, curso longo e assintomático da doença. Além desses, existem

os fatores de confusão, tanto ambientais como etilismo crônico e coinfeções, como virais (diferentes genótipos e cargas virais), ou fatores do hospedeiro, entre eles os fatores imunológicos e a idade de contaminação pelo HCV, parecendo ser esse o maior preditor de evolução (POYNARD et al., 2003). É sabido que o VHC é um vírus hepatotrófico e os receptores celulares CD81, SR-B1, CLDN1 e OCLN desempenham um papel fundamental na entrada do VHC e, conseqüentemente, no seu tropismo celular (PLOSS et al., 2009; STERLING; LIM, 2012). A progressão da fibrose não é linear ao longo dos anos, sendo mais lenta em pacientes jovens e mais acelerada após os 45 a 50 anos de idade.

A forma aguda da doença é frequentemente assintomática e apenas 20% dos pacientes desenvolvem icterícia. Aproximadamente 20% dos casos agudos experimentam cura espontânea do HCV. Entretanto, a grande maioria dos casos, cerca de 75% a 85% dos pacientes, progride para a infecção crônica (SEEFF, 2002). Trabalhos retrospectivos, utilizando grandes casuísticas de hepatites pós-transfusionais, estipularam que o tempo médio para desenvolvimento de hepatite crônica variou de 10 a 13 anos, de cirrose 21 anos e de carcinoma hepatocelular 29 anos (COELHO et al., 1998) (Figura 8).

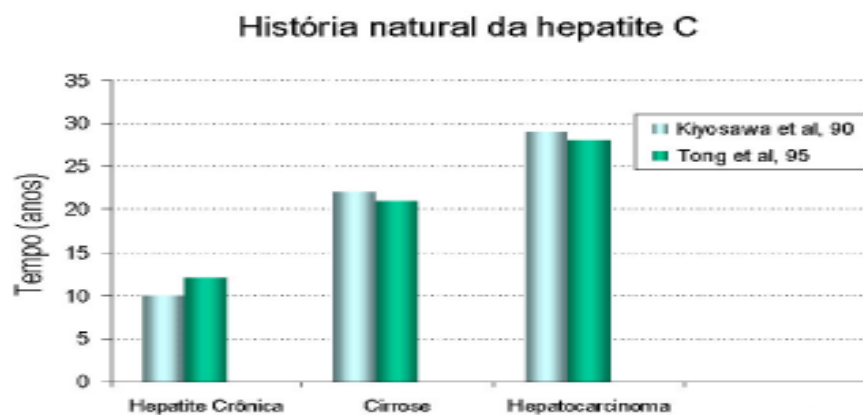


Figura 8: Tempo de evolução da lesão hepática, em anos, após hepatite transfusional
Fonte: adaptado de TONG *et al.*, 1995.

Já nos poucos estudos prospectivos, com baixos percentuais de cronicidade, o tempo de seguimento é pequeno. Pacientes infectados por outras vias, que não a transfusional, demonstraram evolução mais benigna da hepatite C, com pouca evidencia de progressão para cirrose e nenhuma complicação fatal relacionada à doença hepática em 20 anos de evolução (ALVARIZ, et al., 2002).

Em outro estudo, um grupo homogêneo de mulheres jovens, infectadas pelo HCV, agudamente ao terem recebido imunoglobulina anti-D contaminada, foram estudadas 19-

20anos após a infecção, sendo demonstradas alterações hepáticas muito discretas e em apenas 2% delas havia cirrose(ROGGENDORF; MEISEL; VIAZOV, 2000; WIESE et al., 2000). Todos esses trabalhos apontam para uma evolução lenta da infecção pelo HCV, embora haja relatos de casos com progressão mais acelerada, usualmente relacionada aos fatores de pior prognóstico já mencionados anteriormente(SEEFF, 2002). Segundo esse mesmo autor, a infecção crônica pode desenvolver-se com ou sem alteração das aminotransferases, associada ou não a inflamação crônica e fibrose hepática progressiva.

2.6 Diagnóstico da infecção pelo HCV

Por se tratar de uma doença habitualmente de evolução crônica e assintomática na maioria dos casos, a suspeita de que um paciente tem hepatite C geralmente se dá pelos resultados de exames laboratoriais alterados (AST e ALT elevados e plaquetopenia). A próxima etapa, então, é a confirmação sorológica(IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013).

O teste sorológico para triagem e diagnóstico de hepatite C, rotineiramente mais utilizado desde o início dos anos 90, é um teste imunoenzimático chamado ELISA(do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), que adquiriu maior sensibilidade e especificidade ao passar de testes de primeira e segunda para terceira e quarta gerações (ELISA III ou IV). A metodologia utilizada para o desenvolvimento desses ensaios está baseada na organização genômica do VHC. O genoma possui vários segmentos codificadores de proteínas (antígenos) estruturais e não-estruturais que podem desencadear a produção de anticorpos. Os primeiros testes, denominados de testes de primeira geração, empregavam apenas uma proteína não-estrutural (c100-3). A utilidade clínica era limitada, devido à demora no surgimento dos anticorpos contra essa proteína, em média 24 semanas, porém representou um grande avanço na prevenção da infecção pós-transfusional não-A, não-B. Para aumentar a sensibilidade do método e diminuir o tempo necessário para a detecção dos anticorpos após a infecção, foram desenvolvidos testes que incluem uma combinação de antígenos. Os testes de segunda geração detectam anticorpos contra os antígenos c22, c33, c100 e 5-1-1, o tempo de soroconversão diminuiu para, em média, 15 semanas. Os testes de terceira geração diferem dos de segunda por incluírem antígenos da região NS5 (BRANDÃO et al., 2001; SCOTT; GRETCH, 2007).

Embora extremamente útil para o diagnóstico das hepatites crônicas, especialmente nos pacientes com alterações de transaminases e epidemiologia sugestiva para HCV, o ELISA costuma apresentar resultado negativo nos primeiros meses após a contaminação, dificultando

o diagnóstico etiológico nas fases iniciais da hepatite aguda pelo HCV ou mesmo falseando um resultado negativo em doadores de sangue contaminados (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013).

A confirmação do resultado do teste de ELISA pode ser realizada por testes mais específicos, como o ensaio RIBA (do inglês *recombinant immunoblot assay*) ou pela metodologia de detecção do genoma viral, baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) (BOYER; MARCELLIN, 2000). No ensaio RIBA os antígenos do VHC são individualizados em uma fita de nitrocelulose (SANTOS et al., 1994). Em grupos de alto risco, tais como os indivíduos com doença clínica do fígado e/ou níveis de ALT elevados, a taxa de concordância entre os dois testes geralmente é alta (IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013). A PCR é considerada a técnica “padrão-ouro” no diagnóstico do VHC, pois é capaz de detectar pequenas quantidades de vírus no soro, durante as primeiras semanas após a exposição ao vírus. É uma das técnicas de biologia molecular mais utilizadas que amplifica parte do genoma do vírus, sendo extremamente sensível e específica. Outra variante técnica é aquela que, em vez de parte do genoma viral amplifica-se o sinal de sua presença, conhecida como branched DNA (bDNA), muito mais reprodutíveis, porém menos sensíveis do que a PCR. Assim, nas cargas virais altas as quantificações pelo bDNA mostram-se mais reprodutíveis do que pela PCR, embora essas últimas sejam mais sensíveis, podendo diagnosticar pequeno número de cópias (acima de 20 ou 50 cópias), sendo por isso preferidas pela maioria dos investigadores (ZAAIJER et al., 1993; GHANY et al., 2009; IRSHAD; MANKOTIA; IRSHAD, 2013).

Assim, para confirmação diagnóstica de hepatite C aconselha-se, pelo menos, a determinação qualitativa do RNA-HCV, de preferência pelo método da PCR. As determinações quantitativas (carga viral), por outro lado, mostram-se mais interessantes antes do início do tratamento, juntamente com a determinação do genótipo, para definir-se a duração do tratamento. Elas também são utilizadas para monitorizar a resposta terapêutica ou para acompanhamento de casos não tratados, sendo essa a técnica realizada nos Centros de Referência para diagnóstico das hepatites virais, por determinação do Ministério da Saúde (Portaria conjunta nº 193, de 17 de março de 2014).

No Brasil, desde 1993, há a obrigatoriedade de realização de testes sorológicos anti-HCV em candidatos a doação sanguínea, entretanto, só foi estabelecida em portaria desde 2004 (Portaria nº 112/GM/MS, de 29 de janeiro de 2004), mas só em 2010 efetivamente colocada em prática a utilização pelos bancos de sangue nacionais o teste NAT (do inglês *Nucleic Acid Amplification Technology*), como segundo teste padrão para detecção do HCV

nas amostras negativas ao ELISA de doadores de sangue, diminuindo a janela imunológica de 70 dias para 15 dias, portanto aumentando a segurança nos procedimentos transfusionais. Por ser uma tecnologia de amplificação de ácido ribonúcleico (RNA), essa técnica passou a possibilitar não apenas a triagem dos doadores possivelmente infectados, mas também a fixação do diagnóstico precoce da infecção pelo HCV (BRASIL, 2014. Portaria conjunta nº 193).

2.7 Fatores correlacionados à lesão hepática pelo HCV

Quando analisamos a relação entre a hepatite C crônica e a lesão hepática, não se trata apenas da consequência direta da destruição dos hepatócitos pelo vírus e sim, do resultado de uma resposta imune intermediária, que causa destruição em massa dos hepatócitos e, posteriormente, fibrose, sem que haja a eliminação do vírus de seus reservatórios(BELLENTANI et al., 1999).

Alguns mecanismos são apontados como responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV e a progressão da fibrose. A existência de uma grande variedade de quasiespecies, refletindo a grande capacidade mutagênica do vírus, propicia o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Assim, cerca de 85% dos indivíduos infectados evoluem para a cronicidade. A infecção crônica pelo HCV, além de evoluir lentamente, em anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma(STRAUSS, 2001). Além da existência das quasiespecies, outros fatores a serem considerados são a longa evolução da doença, a concomitância de elevada carga viral, alta taxa de replicação viral e alguns genótipos. Estudos sugerem que o genótipo 1 pode ser mais citopático ou pode induzir mais rapidamente a progressão da doença quando comparado com os outros tipos (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Existem algumas evidências do efeito citopático direto do HCV, incluindo lesão histológica induzida pelo HCV com mínimos infiltrados inflamatórios, hepatite fulminante após quimioterapia no transplante hepático e síndrome colestática aguda relacionada ao HCV após transplante renal, por outro lado, contrariando essas observações há a longa evolução da doença, a concomitância de elevada carga viral, a ausência de alterações enzimáticas e alterações histológicas mínimas ou ausentes, constituem dados clínicos contrários ao efeito citopático direto do HCV(VISO, 2007).

Nos últimos anos, diferentes pesquisas têm evidenciado que as lesões hepáticas se relacionam a mecanismos imunomediados (THIMME; LOHMANN; WEBER, 2006; LLOYD et al., 2007). A qualidade da resposta imunológica célula-mediada parece ser crucial para a eliminação ou persistência do HCV, sendo essa a hipótese mais aceita ultimamente.

O sistema imune inato responde ao HCV ativando citocinas como o IFN-1 α e IFN-1 β , os quais ativam proteínas antivirais que inibem a replicação do vírus enquanto o sistema imune adaptativo neutraliza partículas virais e destrói as células infectadas (THIMME; LOHMANN; WEBER, 2006). Os linfócitos T CD4, como se sabe, apresentam respostas distintas Th1 e Th2. Enquanto as células Th1 secretam interleucina 2 e interferon gama estimulando a resposta antiviral do hospedeiro, as células Th2 produzem interleucinas 4 e 10, que estimulam a formação de anticorpos e inibem a resposta Th1. O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 é responsável tanto pela incapacidade de eliminação do VHC como pela maior ou menor gravidade da lesão hepática (LLOYD et al., 2007; VISO, 2007). Uma série de outros fatores suporta a influencia na progressão da lesão hepática em pacientes cronicamente infectados pelo HCV pela resposta imune do próprio hospedeiro, a saber, a falha na resposta das células dendríticas, fraca resposta humoral ao vírus, resposta inadequada dos linfócitos T citotóxicos, maior expressão de moléculas do complexo MHC-classe II, perda da reatividade das células T CD4⁺ ao HCV, aumento nos níveis de citocinas (IFN- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8) (MAGNONI, 2014).

Na infecção pelo HCV, o estado imune do hospedeiro e sua constituição genética são fatores importantes na persistência e progressão do vírus, uma vez que eles influenciam o reconhecimento e apresentação antigênicos, bem como a resposta imune tipo Th. Outra importante linha de pesquisa na busca de elucidação patogênica da hepatite C é o estudo das interações entre proteínas virais e do hospedeiro. Algumas proteínas do HCV teriam capacidade de disparar um sinal iniciador de processos celulares como proliferação, diferenciação ou apoptose. Em investigação posterior, se demonstrou que a proteína do *core* do HCV teria o sinal mais potente para iniciar as alterações celulares (KATO, 2001; VISO, 2007). Além da presença do HCV em linfócitos e monócitos do sangue periférico, foram detectadas faixas negativas de RNA-HCV em células hematopoiéticas, sugeridas como local extra-hepático de replicação do HCV, influenciando em sua patogênese (KANTO; HAYASHI, 2006).

Como já mencionado anteriormente, existem também fatores extrínsecos ao hospedeiro relacionados à progressão da hepatite C crônica: consumo de álcool, tabagismo,

inoculação endovenosa do vírus e coinfecção com outros vírus (HIV, HBV e HTLV)(POYNARD et al., 2003).

Assim, a lesão hepatocelular se faz pelo reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição. A dinâmica desse processo mostra-se extremamente variável, fazendo com que a reação necro-inflamatória do fígado tenha diferentes intensidades. Admite-se que o processo inflamatório contínuo e ineficiente, em termos de eliminação total dos vírus, constitui o principal responsável pela fibrogênese. Entretanto, como não existe uma correlação direta entre processo inflamatório e fibrogênese, outros fatores devem estar envolvidos no desenvolvimento da fibrose hepática, principal fator de progressão da doença.

Como os níveis séricos de RNA-HCV não refletem corretamente os níveis de RNA-HCV intra- e extra-hepáticos, tornam-se necessárias maiores investigações sobre essa variável, de mais difícil acesso, assim como estudos sobre a replicação viral. Em relação ao genótipo, o mais frequente deles - 1b é reconhecidamente aquele com pior resposta terapêutica e os genótipos 2 e 3 são preditivos de boa resposta terapêutica, mas é discutível ser aquele causador de lesões hepáticas mais graves(WIESE et al., 2000). Os estudos iniciais associavam o genótipo 1b com evolução mais frequente para cirrose e hepatocarcinoma, não confirmados quando afastados elementos de confusão como idade, duração da infecção ou forma de aquisição do HCV. Ou seja, o genótipo 1b associava-se com pacientes mais idosos, com muito tempo de infecção ou nos pacientes com doença adquirida por via transfusional, talvez por ser filogeneticamente mais antigo. Estudos mais recentes demonstram que a distribuição dos diferentes genótipos pode ser semelhante em pacientes com enzimas séricas normais quando comparado àqueles com enzimas aumentadas(KONDO; UENO; SHIMOSEGAWA, 2011).

A progressão da lesão hepática, de hepatite crônica para cirrose, pode ainda relacionar-se a fatores do hospedeiro, ou seja, sexo, idade, uso de álcool ou concomitância com outros vírus. O mais importante dos fatores do hospedeiro, entretanto, parece ser o seu estado imunológico. Assim, uma resposta imunológica vigorosa pode eliminar o HCV em 15% dos indivíduos que entram em contato com ele, enquanto em pacientes crônicos, ou imunossuprimidos a doença evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos imunocompetentes(HOPPE et al., 2006).

Fatores hormonais e genéticos devem estar implicados na patogênese da hepatite pelo HCV, sendo aceito que a doença costuma progredir mais rapidamente no sexo masculino, já com esteatose hepática e portadores de doença metabólica como o diabetes melitus. A idade

do paciente ao adquirir a infecção também se mostra relevante, havendo pior prognóstico naqueles com idade superior a 40 anos(WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

2.8 Métodos não invasivos de avaliação da fibrose hepática

A hepatite C crônica afeta cerca de 123 - 170 milhões de pessoas no mundo e 3 milhões no Brasil (Ministério da Saúde/ SBH, 2011; OMS, 2007; SEEFF, 2002). Esta infecção é a principal causa de cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e de indicação para transplante hepático (OMS, 2007). O prognóstico e o manejo da hepatite C crônica, assim como de outras causas de doença crônica do fígado passa, obrigatoriamente, pela necessidade de quantificação, avaliação da progressão e regressão da fibrose hepática. A quantificação da fibrose hepática é um critério fundamental para a indicação ou não do tratamento específico e também para a determinação do prognóstico.

O diagnóstico da fibrose hepática é, antes de tudo, morfológico e estabelecido pela análise histológica da biópsia do fígado, considerada o exame padrão-ouro para o estadiamento de fibrose. Entretanto, este método não é um padrão-ouro ideal, por ser método invasivo, não isento de riscos de sangramentos, necessidade de internação hospitalar e, raramente, óbito, ser uma avaliação estática (não evolutiva - que não é facilmente passível de repetição ao longo do tempo para acompanhamento) e apresentar problemas de reprodutibilidade (em razão da extensão dos fragmentos obtidos que fornecem uma amostragem restrita do parênquima hepático - 1/50.000) e da variabilidade interobservadores. Além disto, muitos pacientes se recusam a se submeter a este procedimento ou têm alguma contra-indicação clínica para o mesmo. Assim, baseado nestas dificuldades, nos últimos anos um grande número de testes não invasivos foram desenvolvidos buscando substituir esse procedimento(CHOURE; WASSON, 2013; VERGNIOL, et al., 2011; PARISE, et al., 2006; PARISE, 2008).

Existem basicamente três tipos de marcadores, os biológicos (biomarcadores diretos e indiretos e os testes respiratórios) e os métodos físicos representados principalmente pela elastometria. Os biomarcadores séricos, quando utilizados isoladamente, apresentaram acurácia diagnóstica limitada e acabaram sendo combinados em índices que apresentavam melhor sensibilidade e especificidade, sendo os mais utilizados nas hepatites virais aqueles apresentados na tabela 1, juntamente com os parâmetros empregados para sua determinação (CHOURE; WASSON, 2013; VERGNIOL, et al., 2011; PARISE, et al., 2006; PARISE, 2008).

Tabela 1: Testes bioquímicos não invasivos no estadiamento da doença hepática viral e seus componentes

Teste	Marcadores
índice APRI	AST e plaquetas
Fibrotest	Haptoglobina, bilirrubinas, GGT, $\alpha 2$ macroglobulina e apolipoproteína, ALT
Fibrometer	$\alpha 2$ macroglobulina, plaquetas, tempo de protrombina, AST com ou sem ácido hialurônico
Hepascore	Idade, gênero, $\alpha 2$ macroglobulina, ácido hialurônico, bilirrubinas, GGT
índice de Forns	Plaquetas, GGT, idade
ELF	Ácido hialurônico, procolágeno PIII, metaloproteinase
FIB-4	FIB-4 Idade, AST, ALT e plaquetas

FONTE: PARISE, 2008.

Desses índices, os mais conhecidos e utilizados em todo mundo são, sem dúvida, o Fibrotest e o APRI. Os biomarcadores são testes que levam em conta uma composição de várias dosagens de substâncias do sangue, direta ou indiretamente relacionadas à fibrose, compondo escores numéricos, cujo resultado final é capaz de inferir o estadiamento de fibrose hepática. As vantagens práticas da análise de biomarcadores séricos para medir a fibrose incluem a sua elevada aplicabilidade (> 95%), a sua boa reprodutibilidade entre laboratórios, a facilidade da coleta do sangue periférico para aquisição dos dados e a sua ampla disponibilidade potencial (não patenteado). No entanto, nenhum deles é específico do fígado e os seus resultados podem ser influenciados por alterações na clearance e excreção de cada um dos parâmetros individuais, além de que algumas situações clínicas ou medicamentos podem afetar a sua dosagem, podendo limitar a acurácia do método. Por este fato, sempre será importante uma avaliação clínica do caso para a correta interpretação dos resultados. Embora os estudos originais de cada um desses testes tenderem a demonstrar sua superioridade sobre os outros, estudos independentes mostram acurácia diagnóstica comparável entre eles (PARISE, 2008; CASTERA; PINZANI, 2010; DEGOS et al., 2010; STEBBING et al., 2010). Dentre os métodos biofísicos, o mais bem estudado e validado é a elastometria transitória hepática, medida com o FIBROSCAN[®]. Esta técnica consiste aferição da velocidade de uma onda de deformação elástica de baixa frequência (50 Hz) que se propaga através do fígado, produzidas por um eixo vibrador acoplado a um transdutor de ultrassom unidimensional, atravessam o tecido hepático, medindo o grau de elasticidade (ou rigidez) do fígado em um

volume a cerca de 100 vezes maior que o volume do fragmento obtido em biópsias. Quanto mais rígido o tecido, mais rapidamente a onda de deformação se propaga. Técnica realizada com o doente deitado de costas e seu braço direito elevado a facilitar o acesso ao lobo direito do fígado. A ponta da sonda entra em contato com a pele intercostal, com gel para contato, do 9º ao 11º espaço intercostal, ao mesmo nível em que seria realizada uma biópsia do fígado. O método é completamente indolor, não invasivo, sem desconforto para o paciente, de rápida execução (5 a 10 min) e destituído de complicações. Pode ser utilizado em consultório médico, com a comodidade semelhante a de um aparelho de ultrassom. A análise do resultado é feita pelo equipamento, independentemente da interpretação do operador, através de um software, que transforma a velocidade da propagação da onda vibratória em elasticidade/rigidez. O resultado é liberado em quiloPascal (kPa) e variam de 1,5 a 75 kPa com valores normais de cerca de 5 kPa. Portanto, é um método promissor do ponto de vista de representatividade do tecido hepático e reprodutibilidade analítica. Várias outras técnicas de imagem baseadas na elasticidade do fígado estão a ser desenvolvidas, incluindo técnicas baseadas em ultrassom e elastografia de ressonância magnética (RM) a 3-D. Dentre as limitações mais importantes do método salienta-se: presença de ascite inviabiliza a sua execução e alterações anatômicas que impeçam a aquisição dos dados como a obesidade. Mais recentemente, alguns estudos avaliaram a associação da elastometria hepática pelo FIBROSCAN e biomarcadores para previsão do estadiamento de fibrose hepática em hepatite C crônica. Além de aumentar muito a acurácia, a associação de métodos não invasivos foi capaz de evitar, com segurança, a realização de cerca de 75% das biópsias hepáticas, quando os resultados dos testes eram concordantes (PARISE, 2008; CASTERA; PINZANI, 2010; DEGOS et al., 2010; STEBBING et al., 2010).

Em conclusão, podemos considerar que os métodos não invasivos devem ser empregados para o estadiamento da fibrose hepática, com excelente acurácia e segurança. Apenas em cerca de 25% dos casos, ainda será necessária a realização de biópsia hepática, particularmente, quando houver não concordância dos testes não invasivos.

2.9 Infecção extra-hepática pelo HCV: o sistema hematopoiético

Segundo o Ministério da Saúde (2010) a prevalência de hepatite C no Brasil é de aproximadamente 2,5 milhões de pessoas reagentes para o anti-HCV. Entretanto, a Sociedade Brasileira de Hepatologia em um estudo realizado nas capitais brasileiras revelou que apenas 16% da população total do país já tinha sido testada para hepatite C, tornando evidente que a maior parte dos infectados pelo vírus ainda não foi diagnosticada (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011; BRASIL, 2011). Mais grave é que a prevalência total esperada de hepatite C seria de aproximadamente 1.450.000 casos até 2014 (BRASIL, 2015). Todavia, nos últimos seis anos, apenas 60.000 pacientes com hepatite C receberam tratamento antiviral no país (BRASIL, 2012).

A persistência viral nos hepatócitos resulta em hepatite crônica, fibrose progressiva com consequente cirrose e um risco aumentado de hepatocarcinoma. Porém, o HCV além de hepatotrópico, também tem atividade comprovadamente pleotrópica, ou seja, ele persiste e se replica em outros tecidos, mostrando tropismo marcante pelas células tronco da medula óssea e pelos linfócitos e monócitos circulantes (ABOU EL AZM et al., 2012). Vários estudos descrevem que 40 a 74% dos pacientes infectados pelo HCV deverão desenvolver pelo menos uma das manifestações extra-hepáticas durante o curso da infecção crônica, por outro lado as síndromes extra-hepáticas poderiam representar o primeiro sinal da infecção pelo HCV, uma vez que muitos pacientes podem não apresentar sintomas hepáticos (GALOSSO et al., 2007).

Os tecidos extra-hepáticos infectados atuam como um reservatório para o HCV e desempenham importante papel tanto na persistência do vírus quanto na sua reativação (FERRI et al., 1993). Uma importante característica do HCV é o mecanismo de evasão, impedindo sua eliminação pelo sistema imune, como consequência levando a infecção crônica, um acúmulo de imunocomplexos circulantes e de fenômenos autoimunes. O HCV mostra particular linfotropismo, além do tropismo hepático, que é responsável por muitas manifestações extra-hepáticas (AGNELLO; DE ROSA, 2004), notadamente no sistema hematopoiético.

A crioglobulinemia mista (tipo II e III) é a manifestação extra-hepática mais bem documentada da infecção pelo HCV, caracterizada por vasculite nos pequenos vasos, envolvendo principalmente pele, as articulações, sistema nervoso periférico e os rins, decorrente da precipitação reversível de imunoglobulinas em baixas temperaturas, com prevalência acima de 70% em algumas séries (CACOUB et al., 2016). Vários estudos descreveram a associação entre a infecção pelo HCV e o desenvolvimento de linfoma não-

Hodgkin (LNH) de células B. FRANCESCHI S *et al* (2006), em metanálise de 48 estudos concluíram que a prevalência de hepatite C nos portadores de LNH de células B foi de 15%, o que é significativamente maior do que o observado na população geral (ao redor de 1,5%)(FRANCESCHI et al., 2006). Também tem sido descrita uma gamopatia monoclonal, mais frequentemente do tipo IgM/k, diagnosticada como gamopatia de significado indeterminado (MGUS), as quais devem ser monitoradas com a finalidade de excluir a pequena possibilidade de evolução para mieloma múltiplo(ANDREONE et al., 1998).

É sabido que anemia, neutropenia, leucopenia e plaquetopenia estão entre os numerosos efeitos colaterais das medicações antivirais que foram usadas até 2014. Todavia, diversos estudos sugerem que a própria infecção pode induzir anemia hemolítica, leucopenia e plaquetopenia(MOCCIA; TOGNONI; BOCCACCIO, 2001; DIETERICH; SPIVAK, 2003). A redução do número de plaquetas é um achado frequente em portadores do HCV e usualmente esta associada ao desenvolvimento de formas mais avançadas de doença hepática. Hiperesplenismo, processos autoimunes, destruição periférica por mecanismo imune, deficiência de folato, diminuição nos níveis de trombopoetina e eritropoietina, levando a inibição medular da proliferação das células progenitoras e outros muitos fatores ainda desconhecidos estão implicados no acometimento do sistema hematopoético dos pacientes infectados pelo HCV(CACOUB et al., 2016). Essas desordens hematológicas podem influenciar na resposta imune do hospedeiro ao vírus, na persistência e reativação viral, na adesão ao tratamento bem como no próprio tratamento, certamente comprometendo o prognóstico da patologia.

Existem muitos relatos de alterações hematológicas medulares em portadores crônicos do HCV, entretanto os estudos realizados até o momento se destinaram a pacientes infectados e sintomáticos de doença hepática e/ou hematológica que foram encaminhados a atendimento médico terciário para investigação de citopenias. Nenhum estudo foi encontrado que abordasse a avaliação das alterações em medula óssea, numa fase mais precoce da infecção, com pacientes ainda assintomáticos do ponto de vista hematológico e hepático.

KLCO et al., (2010) analisaram, retrospectivamente, 47 pacientes monoinfectados pelo HCV, com exclusão dos pacientes infectados por HIV, HAV agudo ou HBV, que foram submetidos à biópsia de medula óssea por apresentarem alguma citopenia. As alterações em medula óssea não se correlacionaram com o estágio ou a extensão da fibrose hepática e cirrose, nem com as medicações antivirais em uso, o escore MELD apresentado e o grau de esplenomegalia(KLCO et al., 2010). Nesse estudo, foram detectadas alterações mais importantes em medula óssea em 50,5% dos pacientes avaliados que apresentavam leucemia

mielóide aguda (LMA), mieloma múltiplo (MM), linfoma linfocítico/leucemia linfóide crônica (LLC), sindromemielodisplástica (SMD), hiperplasia eritróide e/ou megacariocítica, agregados linfóides, hemofagocitose, linfócitose clonal, diseritropoiese e anemia de doença crônica. Os autores não puderam avaliar a viremia e os genótipos virais, por isso nenhuma correlação foi estabelecida com esses dados. BELLENTANI (1999) e MOATTER (2002) mostraram que o genótipo 1b é o que constitui maior fator de risco à presença de cirrose e/ou de carcinoma hepatocelular. No entanto não existem pesquisas que permitam estender essa mesma relação às alterações em medula óssea (BELLENTANI et al., 1999; MOATTER et al., 2002).

ANWAR et al., (2012) também descreveram alterações em medula óssea de 75 pacientes com hepatite C, encaminhados para biópsia de medula óssea durante a investigação de algum tipo de citopenia periférica. Todos os pacientes apresentavam alterações hematológicas periféricas importantes (pancitopenia, bicitopenia, trombocitopenia ou apenas anemia), além de doença hepática avançada já com esplenomegalia avançada, hemorragia digestiva alta e/ou febre. Nesse estudo só foram avaliados a celularidade medular e carências vitamínicas (ferro, folato e vitamina B12), não se estendendo o estudo a viremia e aos genótipos virais, mostrando mais uma vez, a necessidade de se avaliar pacientes infectados assintomáticos (ANWAR; HASSAN; ASIF, 2012).

Nesse mesmo ano, em um outro estudo conduzido por ABOU EL AZM et al., (2012), envolvendo 30 pacientes, os autores descreveram alterações celulares em medula óssea significantes em pacientes infectados com HCV, mas somente naqueles que apresentavam RNA-HCV intramedular (53,33%), comparando-os com pacientes infectados, porém sem RNA-HCV presente na medula óssea. A carga viral plasmática nos pacientes com RNA-HCV intramedular variou de intermediária a alta, mostrando correlação significativa com as alterações medulares encontradas, porém os genótipos não foram avaliados e os 30 pacientes analisados já apresentavam anemia sintomática (ABOU EL AZM et al., 2012).

Esses estudos foram realizados em pacientes já com doença hepática avançada sintomática e com alterações hematológicas periféricas importantes, onde já se espera alterações hematológicas medulares mais severas e irreversíveis, de etiologia multifatorial.

As alterações hematológicas podem influenciar na persistência e reativação do HCV, na adesão e no tratamento para hepatite C, comprometendo o prognóstico dessa patologia (DIETERICH; SPIVAK, 2003). Assim, a identificação e a compreensão sobre a instalação dos distúrbios hematológicos associados ao HCV, bem como do seu diagnóstico precoce torna-se relevante, uma vez que esses pacientes podem beneficiar-se de uma

abordagem mais precoce com tratamento específico, mesmo antes de se enquadrarem nos critérios hepáticos estabelecidos pelo Ministério da Saúde, impedindo a progressão destas alterações.

Diante do exposto, esse estudo descreveu as frequências das alterações hematológicas periféricas e medulares em indivíduos infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática, atendidos nos ambulatórios de hepatologia e infectologia, sem tratamento específico e associando-as com genótipos, carga viral e grau de fibrose hepática.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estimara frequência das alterações hematológicas periféricas e medulares, e verificar associação com carga viral, genótipos e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar a frequência das alterações hematológicas periféricas e medulares;
- Verificar a associação entre as alterações hematológicas periféricas com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática;
- Verificar a associação entre as alterações hematológicas medulares com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo descritivo e analítico com o objetivo de verificar a frequência das alterações hematológicas medulares e periféricas, ao se considerar genótipo, carga viral (alta e baixa) e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos quanto a doença hepática avançada.

4.2 População e local da pesquisa

Pacientes entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, sem sintomas de doença hepática avançada, que foram diagnosticados com dois testes distintos para HCV e atendidos nos ambulatórios de referência em hepatologia e infectologia dos Hospitais de Campina Grande (Hospital universitário Alcides Carneiro) e João Pessoa-PB (Hospital Universitário Lauro Wanderley e Complexo de Doenças Infecto Contagiosas Clementino Fraga), no período de janeiro de 2016 a março de 2017.

4.3 Critérios de inclusão

- Indivíduos entre 18 e 60 anos;
- Ambos os sexos.

4.4 Critérios de exclusão

- Co-infectados com HBV, HIV e/ou HTLV I/ II;
- Mulheres grávidas;
- Indivíduos com história clínica de quadro viral agudo com mais de sete dias de duração nos últimos 2 meses;
- Indivíduos com insuficiência renal crônica (IRC) ou doença equivalente que conduza a IRC;
- Indivíduos tratados previamente para o HCV;
- Indivíduos sintomáticos para doença hepática avançada ou hematológica.

4.5 Definição e Categorização das variáveis

Variáveis dependentes

Quadro 1 – Variáveis dependentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Alterações quantitativas periféricas hematológicas	Quantificação das séries hematológicas periféricas: número de hemácias (Hem.), hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), número de leucócitos (Lc) e de plaquetas (PLT), segundo os critérios de classificação da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Considerados como valores normais para a faixa etária de 16 a 60 anos: Mulheres– Hb (g/dl)=14,0 (12,0 – 16,0) Htc (%)= 41 (36 – 46) Hem. 4,6 (4,0 – 5,2 x 10 ⁶ /mm ³) Homens – Hb (g/dl)=15,5 (13,5 – 17,5) Htc (%)=47 (41 – 53) Hem. 5,2 (4,5 – 5,9 x 10 ⁶ /mm ³) Lc= 3.600 a 11.000/mm ³ PLT= 140.000 a 450.000/mm ³ Anemia – valores abaixo das referências de hemácias. Leucopenia – valores abaixo das referências de leucócitos. Plaquetopenia – valores abaixo das referências de plaquetas. Variável qualitativa nominal.	Será considerado o hemograma coletado no dia da entrevista.	1. Anemia 2. Leucopenia 3. Plaquetopenia 4. Sem alterações
Alterações medulares hematológicas	Análise de alterações morfológicas, maturacionais e/ou numéricas observadas na microscopia óptica. Variável qualitativa nominal.	Observação realizada pelo pesquisador e um segundo analisador.	Quanto à celularidade geral: 1. Normocelular 2. Hiper celular 3. Hipocelular Quanto à celularidade série específica: Eritrocítica, Granulocítica e Megacariocítica 1. Normocelular 2. Hiper celular 3. Hipocelular Quanto à maturação celular: 1. Diseritropoiese 2. Disgranulocitopoi ese 3. Dismegacariocito poiese 4. Sem alterações 9. Outras alterações

Variáveis independentes

Quadro 2 – Variáveis independentes

VARIÁVEIS SÓCIODEMOGRÁFICAS			
VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Sexo	Gênero biológico do paciente. Variável qualitativa nominal dicotômica.	Condição de nascimento declarado pelo paciente	1. Masculino 2. Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea/medula óssea. Variável qualitativa ordinal.	Idade contada em anos completos, informado pelo paciente. Variável quantitativa contínua, mas que foi categorizada em três faixas de idade tornando-a em variável qualitativa ordinal.	1. 16 – 49 anos 2. 50 – 60 anos
Estado civil	Estado civil declarado pela pessoa entrevistada em conformidade com a lei civil, sendo referida durante aplicação do formulário (Apêndice A). Variável qualitativa nominal.	Estado civil declarado pela pessoa entrevistada após orientação quanto a classificação do IBGE*: Casado(a) - para a pessoa que tinha o estado civil de casada; União estável - relação de convivência entre dois cidadãos que é duradoura e estabelecida com o objetivo de constituição familiar; Desquitado (a) ou separado (a) judicialmente - para a pessoa que tinha o estado civil de desquitada ou separada homologado por decisão judicial; Divorciado(a) - para a pessoa que tinha o estado civil de divorciada homologado por decisão judicial; Viúvo(a) - para a pessoa que tinha o estado civil de viúva; Solteiro(a) - para a pessoa que tinha o estado civil de solteira.	1. Solteiro 2. Casado 3. Viúvo 4. Divorciado 5. Desquitado 6. União estável
Etnia	Segundo os critérios de classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000). VARIÁVEL QUALITATIVA NOMINAL.	Característica declarada pelas pessoas, referida durante aplicação do formulário (Apêndice A). Inclui as seguintes opções de resposta: Branca - para a pessoa que se declarou branca;	1. Branca 2. Preta 3. Parda 4. Indígena

		Preta - para a pessoa que se declarou preta; Amarela - para a pessoa que se declarou de cor amarela (inclui-se nesta categoria a pessoa que se declarou de origem oriental: japonesa, chinesa, coreana etc.); Parda - para a pessoa que se declarou parda. Indígena - para a pessoa que se declarou indígena ou índia. Esta classificação se aplica tanto aos indígenas que vivem em terras indígenas como aos que vivem fora delas.	
Escolaridade	Segundo os critérios de classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000). VARIÁVEL QUALITATIVA NOMINAL.	Maior nível de ensino formal que o sujeito da pesquisa declarou ter concluído, referida durante aplicação do formulário (Apêndice B).	1. Analfabeto 2. 1º grau incompleto 3. 1º grau completo 4. 2º grau incompleto 5. 2º grau completo 6. 3º grau incompleto 7. 3º grau completo

VARIÁVEIS QUANTO AO PERFIL LABORATORIAL DO INDIVÍDUO

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Genótipo do HCV atual	Genotipagem do HCV determinada no soro do paciente. VARIÁVEL QUALITATIVA NOMINAL.	Determinação da genotipagem viral, registrada em prontuário.	1. 1a 2. 1b 3. 2 4. 3
Carga viral do HCV atual	Número de cópias UI/ml do HCV-RNA quantificadas no soro do paciente. VARIÁVEL QUALITATIVA ORDINAL.	Quantificação de cópias do HCV-RNA no soro do paciente, registrada em prontuário.	1. < 600.000UI(baixa) 2. > 600.000UI(alta)

VARIÁVEL DE CONFUNDIMENTO

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Outras virose sintomáticas	Ocorrência de quadro viral sintomático (coriza, febre, mialgia, fadiga inexplicada ou súbita) com duração de mais de 7 dias nos últimos 2 meses. VARIÁVEL QUALITATIVA BINOMINAL.	Informação referida pelo entrevistado.	1. Sim 2. Não
Exposição prévia a substâncias mieloagressoras	Verificação de exposição prévia a substâncias mieloagressoras (agrotóxicos, produtos derivados do benzeno, uso de cloroquina ou SMT x TMP). VARIÁVEL QUALITATIVA BINOMINAL..	Informação referida pelo entrevistado, com detalhamento das medicações em uso.	1. Sim 2. Não
Consumo de bebida alcóolica	Grau de consumo de álcool declarado pelo entrevistado. VARIÁVEL QUALITATIVA	Grau de consumo de álcool declarado pelo entrevistado e classificado	1. Consumo moderado 2. Beber pesado episódico

	BINOMINAL.	de acordo com o National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA): Consumo moderado • Homem – não mais que 4 doses em um único dia e não mais que 14 doses por semana. • Mulher – não mais que 3 doses em um único dia e não mais que 7 doses por semana. Beber pesado episódico – consumo de grandes quantidades de álcool (para mulheres 4 doses e para homens 5 doses) em curto espaço de tempo (cerca de 2h). Consumo pesado – consumir mais do que a dose diária (4 doses para homem e 3 para mulheres) ou semanal (14 doses para homens e 7 para mulheres).	3. Consumo pesado 4. Não consome álcool
--	------------	--	---

4.6 Tipo de amostragem

No presente estudo a amostra foi não probabilística e de conveniência.

4.7 Exames laboratoriais

A quantificação da carga viral e a determinação dos genótipos foram realizados no LACEN –PB, enquanto que o hemograma, os exames bioquímicos e sorológicos nos hospitais de atendimento.

4.8 Coleta de medula óssea

O aspirado de medula óssea foi coletado pela própria pesquisadora, sem necessidade de jejum, em sala de pequenas cirurgias ou no próprio ambulatório de hepatologia, em osso esternal ou em crista ilíaca pósterio-superior com agulha de Rosenthal (Figuras 9 e 10), logo após a coleta o sangue medular era disposto em lâminas para realização de esfregaço. Em seguida foram coradas pelo método de Panótico ou May Grunwald – Giemsa e analisadas pela própria pesquisadora, sendo posteriormente encaminhadas a um segundo hematologista

para análise de concordância. A análise do mielograma obedeceu aos critérios estabelecidos no Quadro 1.



Figura 9: Agulha de aspirado medular tipo Rosenthal
Fonte: UNIT, 2015



Figura 10: Procedimento de coleta de aspirado medular em esterno.

Manúbrio esternal

4.9 Métodos não invasivos para avaliação da fibrose hepática

Na avaliação clínico laboratorial do grau de fibrose hepática foram utilizados métodos não invasivos de predição da fibrose hepática: APRI, FIB 4 e a elastografia hepática transitória.

No APRI se considera o resultado do nível da transaminase TGO (ou AST) e o número de plaquetas. O resultado da transaminase AST/TGO deve ser dividido pelo valor de referencia (máximo) que aparece no resultado do exame. O resultado da divisão é então dividido pelo número de plaquetas e depois esse novo resultado é multiplicado por 100. Se o

resultado do APRI é inferior a 0,5 muito provavelmente não existe fibrose (F0) ou existe um mínimo de fibrose (F1). Resultado superior a 1,5 indica que pode existir uma fibrose avançada (F3) ou até cirrose (F4). No método FIB-4 o cálculo é feito em função da idade do paciente, da transaminase AST (TGO), da contagem de plaquetas e da transaminase ALT (TGP).

No FibroScan ou Elastografia utiliza-se uma vibração ultrassônica de baixa frequência para medir a elasticidade ou dureza do fígado.

4.10 Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande – FCM/CESED sob número **CAAE: 51675715.3.0000.5175**(Anexo A).

4.11 Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e das medidas estatísticas: média e desvio padrão para as variáveis numéricas. Com o objetivo de verificar associação entre duas variáveis numéricas os resultados foram analisados inferencialmente através do teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher quando as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas. O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23. A margem de erro nos testes estatísticos foi de 5%.

4.12 Fluxograma de atendimento

Os compareciam aos ambulatórios portando dois testes sorológicos reagentes para o HCV, nessa primeira abordagem era uma enfermeira treinada que os acolhia e solicitava a PCR e a genotipagem, fazia a notificação inicial e agendava o retorno com os especialista (infetologista ou hepatologista). Na consulta subsequente, os pacientes retornavam com esses exames já realizados, era quando a equipe de pesquisa os abordava para verificações dos critérios de inclusão e exclusão, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido colhia-se o mielograma. Posteriormente os pacientes eram consultados pelos especialistas que lhes solicitavam os demais exames de avaliação da lesão hepática (Figura

11). No período em que foi realizado a pesquisa dos 2.880 paciente atendidos foram descartados 2.850 pelos critérios de exclusão.



Figura 11: Fluxograma de atendimento dos paciente infectados pelo HCV para seleção da amostra

5 RESULTADOS

Alterações hematológicas periféricas e medulares em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, assintomáticos de doença hepática.

Introdução

Pesquisas têm descrito alterações hematológicas medulares e periféricas associadas à hepatite C [1–3]. Elas se desenvolvem tanto por agressão viral direta, quanto pela resposta imune crônica do organismo, expressando-se comumente como citopenias no sangue periférico[4] e alterações em medula óssea, como aplasia, displasia, siderose, hipo/hipercelularidade total ou setorial[3].

Em pacientes monoinfectados pelo vírus da hepatite C (HCV), submetidos à biópsia de medula óssea devido à presença de alguma citopenia, foi demonstrado alterações em medula óssea sem correlação com o uso de antivirais, sugerindo que a disfunção medular é independente do estágio ou da extensão da fibrose hepática[2]. Na hepatite C crônica, sintomática, podem ocorrer alterações medulares e periféricas importantes [5]. Além disso, foi demonstrado que o genótipo 1b é o maior fator de risco associado à presença de cirrose e/ou de carcinoma hepatocelular. No entanto, não existem pesquisas que permitam estender essa mesma relação às alterações em medula óssea[6,7].

As alterações hematológicas periféricas e medulares podem influenciar na adesão e no tratamento para hepatite C, comprometendo seu prognóstico. Assim, a detecção precoce dessas alterações pode auxiliar no tratamento eficaz da hepatite C, sem reduções de dosagem e nem descontinuação dos esquemas em administração, podendo lentificá-las/ou compensá-las com o uso de fatores estimulantes de crescimento de colônias, todavia a sua eficácia depende do prévio conhecimento da celularidade e da normopoiesemedulares[1]. O presente estudo descreve alterações hematológicas periféricas e medulares, em indivíduos infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática, sem tratamento específico associando com genótipo, carga viral e grau de fibrose.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo e população da pesquisa

Trata-se de estudo descritivo analítico envolvendo pacientes de ambos os sexos, de 18 a 60 anos, atendidos em ambulatórios de hepatologia e infectologia, na Paraíba, no período de 01/2016 a 03/2017. Foram excluídos pacientes com sintomas de doença hepática e hematológica avançada, indivíduos co-infectados com HBV, HIV e/ou HTLV I e II, mulheres grávidas, indivíduos com história clínica de quadro viral agudo com mais de sete dias de duração nos últimos 2 meses, indivíduos com insuficiência renal crônica (IRC) ou doença equivalente que conduza a IRC, indivíduos tratados previamente para o HCV. Os pacientes foram entrevistados, assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e em seguida realizado o mielograma e a coleta sanguínea. Os dados da carga viral, genótipo, grau de fibrose hepática, hemograma, exames bioquímicos e sorológicos, ultrassonografia e elastografia hepáticos foram coletados a partir dos prontuários.

Coleta de medula óssea

O aspirado de medula óssea foi realizado pela própria pesquisadora, em osso esternal ou em crista ilíaca póstero-superior, com agulha de Rosenthal, sem necessidade de jejum, em sala de pequenas cirurgias ou no próprio ambulatório. As lâminas foram coradas e analisadas pela própria pesquisadora.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram analisadas através de frequências absolutas e percentuais e as numéricas pela média e desvio padrão. Para associação entre duas variáveis numéricas foram utilizados os testes Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher. O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23. A margem de erro dos testes foi de 5%.

Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande – FCM/CESED sob o número **CAAE**: 51675715.3.0000.5175.

Resultados

Este estudo envolveu 30 pacientes, selecionados por amostra de conveniência à medida que se apresentavam nos ambulatorios especializados e que obedeciam aos critérios determinados na pesquisa. Os dados sócios demográficos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos dados sócios demográficos dos pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	n	%
Sexo		
Masculino	12	40,0
Feminino	18	60,0
Faixa etária (anos)		
25 a 49	14	46,7
50 a 59	16	53,3
Estado civil		
Solteiro	6	20,0
Casado	14	46,7
Viúvo	1	3,3
Divorciado	4	13,3
União estável	5	16,7
Etnia		
Branca	2	6,7
Preta	4	13,3
Parda	24	80,0
Escolaridade		
Analfabeto	1	3,3
1º grau incompleto	8	26,7
2º grau completo	11	36,7
3º grau incompleto	10	33,3

A frequência do genótipo, carga viral e grau de fibrose hepática, no momento da coleta da medula óssea, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Frequência do genótipo, carga viral e grau de fibrose em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variáveis	n	%
Genótipo		
1	1	3,3
1 ^a	6	20,0
1B	17	56,7
2	2	6,7
3	4	13,3
Carga viral		
> 600.000	16	53,3
Até 600.000	14	46,7
Classificação elastográfica de fibrose hepática		
F0	6	20,0
F1	9	30,0
F2	5	16,7
F3	6	20,0
F4	4	13,3

A figura 1 mostra a distribuição das alterações hematológicas periféricas e na tabela 3 está apresentada a distribuição das alterações medulares dos pacientes infectados pelo HCV, sem sintomas de doença hepática avançada.

Figura 1 – Distribuição das alterações periféricas em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

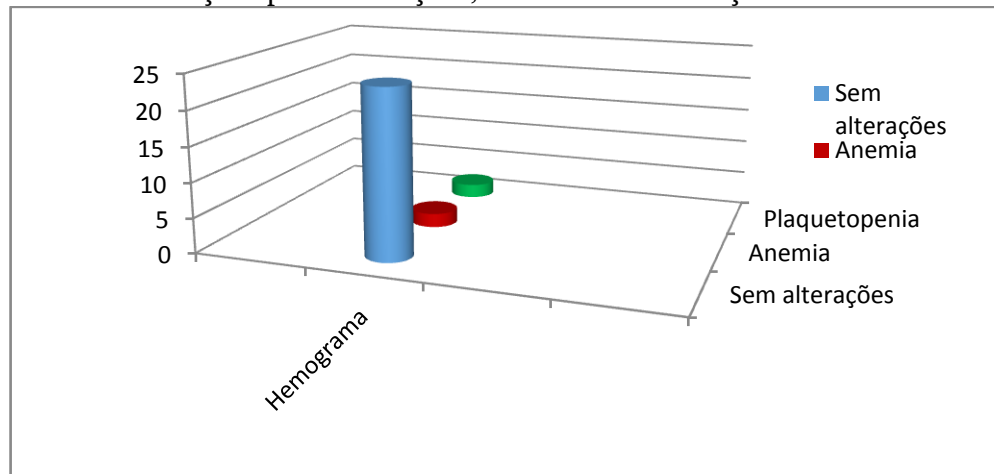


Tabela 3 – Distribuição das alterações medulares em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variáveis	n	%
Alterações de celularidade		
Normocelular	20	66,7
Hipercelular	3	10,0
Hipocelular	7	23,3
Alterações de celularidade específica		
<i>Eritrocitrica</i>		
Normocelular	28	93,3
Hipercelular	2	6,7
<i>Granulocítica</i>		
Normocelular	29	96,7
Hipercelular	1	3,3
<i>Megacariotica</i>		
Normocelular	21	70,0
Hipercelular	8	26,7
Hipocelular	1	3,3
Alterações de maturação celular *		
Diseritropoiese	12	40,0
Disgranulocitopoiese	8	26,7
Dismegacariocitopoiese	10	33,3
Sem alteração	4	13,3

*um paciente pode apresentar mais de uma alteração, podendo a soma das frequências ser superior ao tamanho da amostra.

As associações das alterações hematológicas periféricas com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática estão apresentadas na tabela 4 e as alterações medulares quanto a celularidade e maturação são mostradas na tabela 5 e tabela 6.

Tabela 4 – Associação das alterações periféricas com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	Alterações periféricas				p*
	Presente		Ausente		
	n	%	n	%	
Carga viral					1,000
> 600.000	3	50,0	13	54,2	
Até 600.00	3	50,0	11	45,8	
Genótipo					0,066
1 ^a	1	16,7	5	20,8	
1B	2	33,3	16	66,7	
2	0	0,0	2	8,3	
3	3	50,0	1	4,2	
Grau da fibrose hepática					0,014
F0	1	16,7	5	20,8	
F1	0	0,0	9	37,5	
F2	0	0,0	5	20,8	
F3	2	33,3	4	16,7	
F4	3	50,0	1	4,2	

*p obtido através do teste Exato de Fisher

Foi observado que 50% dos pacientes apresentavam relação entre as alterações periféricas e as respectivas séries medulares, sugerindo comprometimento na hematopoiese medular.

Tabela 5 – Associação da celularidade medular com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	Alterações na celularidade				p
	Presente		Ausente		
	n	%	n	%	
Carga viral					0,961*
> 600.000	9	52,9	7	53,8	
Até 600.00	8	47,1	6	46,2	
Genótipo					0,870**
1A	3	17,6	3	23,1	
1B	10	58,8	8	61,5	
2	1	5,9	1	7,7	
3	3	17,6	1	7,7	
Grau da fibrose hepática					0,900**
F0	4	23,5	2	15,4	
F1	4	23,5	5	38,5	
F2	3	17,6	2	15,4	
F3	3	17,6	3	23,1	
F4	3	17,6	1	7,7	

* p obtido através do teste Qui-quadrado de Pearson. ** p obtido através do teste Exato de Fisher

Tabela 6 – Associação da maturação celular na medula com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	Alterações na maturação celular				p*
	Presente		Ausente		
	n	%	n	%	
Carga viral					0,642**
> 600.000	14	56,0	2	40,0	
Até 600.000	11	44,0	3	60,0	
Genótipo					1,000**
1A	5	20,0	1	20,0	
1B	15	60,0	3	60,0	
2	2	8,0	-	-	
3	3	12,0	1	20,0	
Grau da fibrose hepática					0,219**
F0	6	24,0	-	-	
F1	7	28,0	2	40,0	
F2	4	16,0	1	20,0	
F3	6	24,0	-	-	
F4	2	8,0	2	40,0	

* p obtido através do teste Exato de Fisher

Dos 25 pacientes com alterações medulares, uma apresentava alteração nas três séries, tendo sido confirmado o diagnóstico de mielodisplasia e três apresentavam alterações em duas

séries. Entretanto não houve associação das alterações de celularidade e maturação com carga viral, genótipo e grau de fibrose.

Discussão

Existem muitos relatos de alterações hematológicas medulares e em sangue periférico em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), sintomáticos de doença hepática e/ou hematológica. Este é um estudo transversal, pioneiro no Brasil, a estimar as frequências de alterações hematológicas periféricas e medulares em indivíduos infectados pelo HCV, entretanto quando ainda assintomáticos de doenças hepática e hematológica, não submetidos a tratamento específico prévio, associando-as com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática.

A população estudada foi composta em sua maioria por pacientes do sexo feminino, talvez por maior interesse das mulheres em procurar assistência médica numa fase ainda assintomática da doença hepática e por sua detecção mais precoce nos testes de triagem do pré-natal. Por outro lado, nos estudos envolvendo alterações hematológicas em pacientes com doença hepática avançada, o predomínio foi maior em indivíduos do sexo masculino, com uma razão homem/mulher de 2,0[5,7,8], possivelmente porque a ingestão alcóolica e a doença metabólica gordurosa sejam mais prevalente no sexo masculino, fatores estes sabidamente aceleradores da progressão da doença hepática [9]. A média de idade da pesquisa foi similar aos outros estudos na população de infectados pelo HCV [5,7–9]. Seguindo o padrão de distribuição dos genótipos nas Américas e no Brasil [10–13], neste estudo a maior prevalência foi dos genótipos 1 e 3. Na análise da distribuição dos genótipos com fatores biológicos como idade e sexo, não houve diferença significativa quando comparados com outros estudos brasileiros[13]. Entretanto observou-se maior frequência dos genótipos 2 e 3 em indivíduos com faixa etária menor que 40 anos, corroborando com estudos de MOATTER et al., (2002)[7] e BELLENTANI et al., (1999)[6] que mostraram maior frequência do genótipo 3 em indivíduos adultos jovens.

Alterações hematológicas estão entre as mais comuns manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV, no estudo de KLCO et al., (2010)[2], os pacientes foram encaminhados para análise da medula óssea devido acitopenias periféricas, predominando a bicitopenia. Por outro lado, ANWAR et al., (2012)[5] mostraram o predomínio depancitopenia, talvez por nesse último estudo os pacientes terem maior grau de lesão hepática. Pacientes infectados pelo HCV podem desenvolver alterações em sangue periférico, as quais são comumente atribuídas ao hiperesplenismo, terapia antiviral, diminuição dos

níveis de trombopoetina e/ou mecanismos imunes [14,15]. Em nossa pesquisa os pacientes desconheciam quaisquer doenças hematológicas prévias, contudo foram observadas alterações hematológicas periféricas, notadamente a plaquetopenia, seguindo o padrão descrito na literatura[14,16].

A patogênese da trombocitopenia entre os pacientes infectados pelo HCV é multifatorial, as possíveis causas incluem: sequestro esplênico secundário a hipertensão portal e esplenomegalia com hiperesplenismo, supressão direta da medula óssea pelo HCV ou pelo tratamento antiviral, destruição imune das plaquetas e produção deficiente de trombopoetina devido à lesão hepatocelular[17]. Este estudo não se propôs a investigar as causas das citopenias, entretanto a associação entre as alterações hematológicas em sangue periférico e grau de fibrose, corrobora com outros estudos que mostraram maior prevalência de citopenias em pacientes com doença hepática avançada (pacientes cirróticos e/ou com grau de fibrose F4), onde a intensidade da plaquetopenia reflete a gravidade da lesão hepática[18]. Em relação à carga viral e genótipo não foi observada associação, entretanto não existem dados na literatura para comparação.

Nos pacientes com alterações medulares, não foi observada associação da celularidade e maturação com carga viral, genótipo e grau de fibrose. Contrariamente a pesquisa de ABOU EL AZM et al. (2012) que correlacionaram alta viremia com a presença de alterações em medula óssea, dado não corroborado por este estudo[8].

A maior frequência de alterações hematológicas medulares nos pacientes deste estudo, com predomínio de alterações de maturação, notadamente a desproporção maturativa núcleo citoplasmática e os retardos maturativos, difere dos resultados de ASFOUR et al. (2013) com pacientes portadores de doença hepática avançada, que apresentavam hiperplasmademedular[3]. Essas alterações de maturação podem ser secundárias a diversos fatores além da ação direta do vírus e/ou da resposta imune do hospedeiro, dentre elas: deficiências de ferro, ácido fólico e vitamina B12, como já relatado por ANWAR et al. (2012)[5]. Foi observado que 50% dos pacientes apresentavam relação entre as alterações periféricas e as respectivas séries medulares, sugerindo comprometimento na hematopoiese medular.

Apesar da população deste estudo ser constituída por pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos, sem doença hepática avançada, foram encontradas alterações hematológicas periféricas, predominando a plaquetopenia, além de alta frequência de alterações medulares, com comprometimento da maturação celular. Entretanto, não houve associação das alterações hematológicas medulares com carga viral, genótipo e grau de fibrose, porém foram

encontradas alterações hematológicas periféricas associadas com grau de fibrose. Diante do exposto, a identificação e a compreensão sobre a instalação dos distúrbios hematológicos associados ao HCV, bem como do seu diagnóstico torna-se relevante, uma vez que esses pacientes podem beneficiar-se de uma abordagem mais precoce de sua doença e de tratamento específico, mesmo antes de se enquadrarem nos critérios hepáticos determinados pelo Ministério da Saúde, bloqueando a progressão destes distúrbios antes que se tornem irreversíveis. Portanto, sugerimos acompanhamento hematológico regular em pacientes infectados pelo HCV e assintomáticos de doença hepática.

Conflitos de interesses

Os autores declaram que não tem conflitos de interesses.

Referências

- 1 Dieterich DT, Spivak JL: Hematologic Disorders Associated with Hepatitis C Virus Infection and Their Management. *Clin Infect Dis* 2003;37:533–541.
- 2 Klco JM, Geng B, Brunt EM, Hassan A, Nguyen T-D, Kreisel FH, et al.: Bone marrow biopsy in patients with hepatitis C virus infection: Spectrum of findings and diagnostic utility. *Am J Hematol* 2010;85:106–110.
- 3 Asfour, Ayoub MS, Magid NAA, Elsayharty AAI: Evaluation of bone marrow examination in patients with hepatitis C virus infection. *Egypt J Haematol* 2013;38:13.
- 4 Streiff M, Mehta S, Thomas DL: Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;35:947–952.
- 5 Anwar B, Hassan K, Asif N: Diagnostic Utility of Bone Marrow Examination in Chronic Liver Disease Patients Referred For Evaluation of Hematological Derangements. *Int J Pathol* 2012;10:13–16.
- 6 Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Crocè LS, Mazzoran L, et al.: Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut* 1999;44:874–880.
- 7 Moatter T, Hussainy AS, Hamid S, Ahmad Z, Siddiqui S: Comparative analysis of viral titers and histologic features of Pakistani patients infected with hepatitis C virus type 3. *Int J Infect Dis* 2002 [cited 2017 Aug 12];6:272–6.
- 8 Abou El Azm AR, El-Bate H, Abo-Ali L, Mansour N, Ghoraba H, Salem ML: Correlation of viral load with bone marrow and hematological changes in pale patients with chronic hepatitis C virus. *Arch Virol* 2012;157:1579–1586.
- 9 Mincis M, Mincis R: Esteatose e esteato-hepatite não alcoólicas; in : *Gastroenterologia & Hepatologia*, ed 4. São Paulo, Lemos Editorial, 2011, pp 873–882.
- 10 Lopes CLR, Teles SA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro ARC, et al.: Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. *Rev Saude Publica* 2009;43:43–50.
- 11 Duarte CAB: Detecção e quantificação do vírus da Hepatite C através de RT-PCR em tempo - real 2006 [cited 2017 Aug 13];Available from:

- <http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/6246>
- 12 Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al.: Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2005;38:41–9.
 - 13 Silva LK, Silva MBS, Rodart IF, Lopes GB, Costa FQ, Melo ME, et al.: Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 2006;39:595–602.
 - 14 Afdhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al.: Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* 2008;48:1000–1007.
 - 15 Zhang W, Nardi MA, Borkowsky W, Li Z, Karparkin S: Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* 2009;113:4086–4093.
 - 16 Pawlotsky J-M: Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96–102.
 - 17 WEKSLER BB: Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:13–19.
 - 18 Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D: Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3:3–14.

6 CONCLUSÕES

- Foram encontradas alterações periféricas, predominando a plaquetopenia e alta frequência de alterações hematológicas medulares, com predomínio de alterações de maturação celular;
- Houve associação entre as alterações hematológicas periféricas e grau de fibrose, entretanto essa mesma associação não foi verificada quanto à carga viral e o genótipo;
- Não houve associação das alterações hematológicas medulares com carga viral, genótipo e grau de fibrose.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação e a compreensão sobre a instalação dos distúrbios hematológicos associados ao HCV, bem como do seu diagnóstico precoce torna-se relevante, uma vez que esses pacientes podem beneficiar-se de uma abordagem mais precoce de sua doença, e, portanto, de tratamento específico, mesmo antes de se enquadrarem nos critérios hepáticos estabelecidos pelo Ministério da Saúde, bloqueando a progressão destes distúrbios antes que se tornem irreversíveis.

REFERÊNCIAS

ABOU EL AZM, A. R.; EL-BATE, H.; ABO-ALI, L.; MANSOUR, N.; GHORABA, H.; SALEM, M. L. Correlation of viral load with bone marrow and hematological changes in pale patients with chronic hepatitis C virus. **Archives of Virology**, v. 157, n. 8, p. 1579–1586. 2012.

AGNELLO, V.; DE ROSA, F. G. **Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: Some current issues** **Journal of Hepatology**, 40, n. 2 p. 341–352. 2004.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2436–2441, 2007.

ALVARIZ, F.G., ALVARIZ, R., RIBEIRO, J.F. et al. **Importance of age at transmission on evolution of chronic viral C hepatitis (CHC) to cirrhosis**. **J Hepatol**, v. 36(supl 1), p. 227-228, 2002.

ANDREONE, P.; ZIGNEGO, A. L.; CURSARO, C.; GRAMENZI, A.; GHERLINZONI, F.; FIORINO, S.; GIANNINI, C.; BONI, P.; SABATTINI, E.; PILERI, S.; TURA, S.; BERNARDI, M. Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection. **Annals of internal medicine**, v. 129, n. 4, p. 294–8, 1998.

ANWAR, B.; HASSAN, K.; ASIF, N. Diagnostic Utility of Bone Marrow Examination in Chronic Liver Disease Patients Referred For Evaluation of Hematological Derangements. **International Journal of Pathology**, v. 10, n. 1, p. 13–16, 2012.

ASFOUR; AYOUB, M. S.; MAGID, N. A. A.; ELSAHARTY, A. A. I. Evaluation of bone marrow examination in patients with hepatitis C virus infection. **The Egyptian Journal of Haematology**, v. 38, n. 1, p. 13, 2013.

BARTENSCHLAGER, R.; KAUL, A.; SPARACIO, S. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. **Antiviral Research**, v. 60, n. 2, p. 91–102, 2003.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V. Replication of hepatitis C virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 7, p. 1631–1648, 2000.

BELLENTANI, S.; POZZATO, G.; SACCOCCIO, G.; CROVATTO, M.; CROCÈ, L. S.; MAZZORAN, L.; MASUTTI, F.; CRISTIANINI, G.; TIRIBELLI, C. Clinical course and risk

factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. **Gut**, v. 44, n. 6, p. 874–880, 1999.

BLIGHT, K. J.; MCKEATING, J. A.; MARCOTRIGIANO, J.; RICE, C. M. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. **Journal of virology**, v. 77, n. 5, p. 3181–90, 2003.

BOYER, N.; MARCELLIN, P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. **Journal of hepatology**, v. 32, n. 1 Suppl, p. 98–112, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Hepatites Virais: o Brasil está atento. 3ª edição. Série B: Textos Básicos de Saúde. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ano II - nº 01. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>. Acesso em 24/09/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ano III - nº 01. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em 24/09/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfeccoes. Série A: Normas e manuais técnicos. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional Para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. Brasília – DF, 2015. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/>. Acesso em 20/01/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ano IV - nº 01. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>. Acesso em 24/09/2015

BRADLEY, D. W.; MCCAUSTLAND, K. A.; COOK, E. H.; SCHABLE, C. A.; EBERT, J. W.; MAYNARD, J. E. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. **Gastroenterology**, v. 88, n. 3, p. 773–9, 1985..

BRANDÃO, A. B. de M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. dos A.; EMER, L. F. Diagnóstico da

hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, n. 3, p. 161–168,. 2001.

CACOUB, P.; COMARMOND, C.; DOMONT, F.; SAVEY, L.; DESBOIS, A. C.; SAADOUN, D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 3, n. 1, p. 3–14, 2016.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J.; DA SILVA, L. C.; SOUTO, F. J. D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L. M. M. B.; COELHO, H. S. M.; SILVA, A. O.; FONSECA, J. C.; ROSA, H.; LACET, C. M. C.; BERNARDINI, A. P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 38, n. 1, p. 41–9, 2005.

CASTERA L, PINZANI M. **Biopsy and non-invasive methods for the diagnosis of liver fibrosis: does it take two to tango?** Gut. 2010;59:861-6.

CHOU R, WASSON N. **Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review.** Ann Intern Med 2013;158:807–820.

COELHO, H. S. M.; FIGUEIREDO, F. A. F.; SEGADAS, J. A.; PANAIM, V. L.; NOGUEIRA, C. M.; SILVA, C. R.; MUSSI, T. J. Aspectos evolutivos da hepatite C pós-transfusional. Revisão de 175 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 295–300, 1998.

CRAXI, A. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 245–264, 2011.

DEGOS F, PEREZ P, ASSELINEAU J, BEDOSSA P. **Diagnostic accuracy of FibroScan and comparison to liver fibrosis biomarkers in chronic viral hepatitis: A multicenter prospective study (the FIBROSTIC study).** J Hepatol.2010;53:1013-21.

DE OLIVEIRA, A. C.; BORTOTTI, A. C.; NUNES, N. N.; EL BACHA, I. A. H.; PARISE, E. R. Association between age at diagnosis and degree of liver injury in hepatitis C. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 507–511, 2014.

DIETERICH, D. T.; SPIVAK, J. L. Hematologic Disorders Associated with Hepatitis C Virus

Infection and Their Management. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 533–541, 2003.

DONAHUE, J. G.; MUÑOZ, A.; NESS, P. M.; BROWN, D. E.; YAWN, D. H.; MCALLISTER, H. A.; REITZ, B. A.; NELSON, K. E. The Declining Risk of Post-Transfusion Hepatitis C Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 6, p. 369–373, 1992.

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 71–99, 2007.

FEINSTONE, S. M.; KAPIKIAN, A. Z.; PURCELL, R. H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science (New York, N.Y.)**, v. 182, n. 4116, p. 1026–8, 1973.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473–487, 2004.

FERRI, C.; MONTI, M.; LA CIVITA, L.; LONGOMBARDO, G.; GRECO, F.; PASERO, G.; GENTILINI, P.; BOMBARDIERI, S.; ZIGNEGO, A. L. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. **Blood**, v. 82, n. 12, p. 3701–4, 1993.

FOCACCIA, R.; SOUZA, F. . **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

FOCACCIA; DA CONCEIÇÃO OJ; SETTE; SABINO; BASSIT; NITRINI; LOMAR; LORENÇO; VIEIRA DE SOUZA F; KIFFER; SANTOS; GONZALES; SÁEZ-ALQUÉZAR; RISCAL; FISCHER. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of São Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 2, n. 6, p. 269–284, 1998.

FRANCESCHI, S.; POLESEL, J.; RICKENBACH, M.; DAL MASO, L.; PROBST-HENSCH, N. M.; FUX, C.; CAVASSINI, M.; HASSE, B.; KOFLER, A.; LEDERGERBER, B.; ERB, P.; CLIFFORD, G. M. Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphoma: findings from the Swiss HIV Cohort Study. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 11, p. 1598–1602, 2006.

GALOSS, A.; GUARISCO, R.; BELLIS, L.; PUOTI, C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. **Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD**, v. 16, n. 1, p. 65–73, 2007.

GHANY, M. .; STRADER, D. .; THOMAS, D. .; SEEFF, L. **AASLD Practice Guidelines. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update**. 4. Disponível em: <<https://www.aasld.org>>. Acesso em: 10 out. 2016.

GIBB, D. M.; GOODALL, R. L.; DUNN, D. T.; HEALY, M.; NEAVE, P.; CAFFERKEY, M.; BUTLER, K. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. **Lancet (London, England)**, v. 356, n. 9233, p. 904–7, 2000.

HOPPE, L.; RODRIGUES, C. .; RODRIGUES, T. T. .; RODRIGUES, G. Prevalência de hepatite B e C nos doadores de sangue inaptos e sua evolução clínica. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, p. 350, 2006.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2014 Release**. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 1 jan. 2015.

IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 44, p. 7896–909, 2013.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Internal medicine (Tokyo, Japan)**, v. 45, n. 4, p. 183–91, 2006.

KATO, N. Molecular virology of hepatitis C virus. **Acta medica Okayama**, v. 55, n. 3, p. 133–59, 2001.

KLCO, J. M.; GENG, B.; BRUNT, E. M.; HASSAN, A.; NGUYEN, T.-D.; KREISEL, F. H.; LISKER-MELMAN, M.; FRATER, J. L. Bone marrow biopsy in patients with hepatitis C virus infection: Spectrum of findings and diagnostic utility. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 2, p. 106–110, 2010.

KNIFE, D.; HOWLEY, P.; ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 3. ed. [s.l.] KluwerWolters, 2013.

KONDO, Y.; UENO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Dysfunction of Immune Systems and Host Genetic Factors in Hepatitis C Virus Infection with Persistent Normal ALT. **Hepatitis research and treatment**, v. 2011, p. 713216, 2011.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LINDENBACH, B. D.; EVANS, M. J.; SYDER, A. J.; WÖLK, B.; TELLINGHUISEN, T. L.; LIU, C. C.; MARUYAMA, T.; HYNES, R. O.; BURTON, D. R.; MCKEATING, J. A.; RICE, C. M. Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 623–626, 2005.

LLOYD, A. R.; JAGGER, E.; POST, J. J.; CROOKS, L.-A.; RAWLINSON, W. D.; HAHN, Y. S.; FFRENCH, R. A. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 1, p. 24–32, 2007.

LOHMANN, V.; KÖRNER, F.; KOCH, J.; HERIAN, U.; THEILMANN, L.; BARTENSCHLAGER, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5424, p. 110–3, 1999.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. de L. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 107–112, 2011.

MOATTER, T.; HUSSAINY, A. S.; HAMID, S.; AHMAD, Z.; SIDDIQUI, S. Comparative analysis of viral titers and histologic features of Pakistani patients infected with hepatitis C virus type 3. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, p. 272–6, 2002.

MOCCIA, F.; TOGNONI, E.; BOCCACCIO, P. Autoimmune hemolytic anemia in chronic hepatitis C virus infection: an unusual extrahepatic autoimmune manifestation. **Annali italiani di medicina interna : organo ufficiale della Societa italiana di medicina interna**, v. 16, n. 4, p. 256–9, 2001.

PARISE, E. R. ; OLIVEIRA, A C ; FIGUEIREDOMENDES, C ; LANZONI, V. P. ; MARTINS, J. R. M. ; NADER, H. ; FERRAZ, M L . **Noninvasive serum markers in the diagnosis of structural liver damage in chronic hepatitis C virus infection**. *Liver International* 2006, Inglaterra, v. 26, p. 1095-

1099.

PARISE, E. R. **Avaliação crítica dos métodos não invasivos na determinação da fibrose nas hepatites virais**. Programa de Educação Continuada. Ed. Atha Comunicação e Editora - Criação e Coordenação editorial, 2008. p. 3-6.

PAWLOTSKY, J.-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 96–102, 2004.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F. A.; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J.-M. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5–19, 2004.

PEREIRA, L. M. M. .; XIMENES, R. A. D. .; MOREIRA, R. .; BRAGA, M. .; MONTARROYOS, U, R. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2015.

PERZ, J. .; FARRINGTON, L. .; PECORARO, C.; HUTIN, Y. J. .; ARMSTRONG, G. . Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. In: **42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America**.

PLOSS, A.; EVANS, M. J.; GAYSINSKAYA, V. A.; PANIS, M.; YOU, H.; DE JONG, Y. P.; RICE, C. M. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 882–6, 2009.

POLYAK, S. J.; KHABAR, K. S. A.; PASCHAL, D. M.; EZELLE, H. J.; DUVERLIE, G.; BARBER, G. N.; LEVY, D. E.; MUKAIDA, N.; GRETCH, D. R. Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Induces Interleukin-8, Leading to Partial Inhibition of the Interferon-Induced Antiviral Response. **Journal of Virology**, v. 75, n. 13, p. 6095–6106, 2001.

POYNARD, T.; YUEN, M.-F.; RATZIU, V.; LAI, C. L.; OPOLON, P.; POYNARD, T. Viral hepatitis C. **Lancet (London, England)**, v. 362, n. 9401, p. 2095–100, 2003.

ROBERTS, E. A.; YEUNG, L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 36, n. 5, p. ajhep036s106, 2002.

ROGGENDORF, M.; MEISEL, H.; VIAZOV, S. Natural history of hepatitis C. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. suppl 1, p. 189–192, 2000.

RUSTGI, V. K. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 7, p. 513–521, 2007.

SANTOS, A.; CARVALHO, A.; BENTO, D.; SÁ, R.; TOMÁZ, J.; RODRIGUES, V.; PAIS, L.; PORTO, A. Epidemiology of hepatitis C in central Portugal. Prevalence of anti-HCV in the population of the Coimbra District. **Acta medica portuguesa**, v. 7 Suppl 1, p. S3-8, 1994.

SANTOS, N. O. .; ROMANOS, M. T. .; WIGG, M. . **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCOTT, J. D.; GRETCH, D. R. Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection. **JAMA**, v. 297, n. 7, p. 724, 2007.

SEEFF, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5, p. 360, 2002.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D. G.; OKAMOTO, H.; PAWLOTSKY, J.-M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L. J.; THIEL, H.-J.; VIAZOV, S.; WEINER, A. J.; WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962–973, 2005.

STEBBING J, FAROUK L, PANOS G., et al. **A meta-analysis of transient elastography for the detection of hepatic fibrosis**. *J Clin Gastroenterol*.2010;44:214-9.

STERLING, R.; LIM, J. Chronic Hepatitis C Virus: Advances in Treatment, Promise for the Future. **Gastroenterology**, v. 143, n. 6, p. 1688, 2012.

STOCKMAN, L.; GUILFOYLE, S.; BENOIT, A.; VERGERONT, J.; DAVIS, J. **Rapid Hepatitis C Testing Among Persons at Increased Risk for Infection — Wisconsin, 2012–2013**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6314a3.htm>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n.

1, p. 69–82, 2001.

STREIFF, M.; MEHTA, S.; THOMAS, D. L. Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 947–952, 2002.

SZABÓ, E.; LOTZ, G.; PÁSKA, C.; KISS, A.; SCHAFF, Z. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. **Pathology oncology research**, v. 9, n. 4, p. 215–21, 2003.

TAJIRI, H.; MIYOSHI, Y.; FUNADA, S.; ETANI, Y.; ABE, J.; ONODERA, T.; GOTO, M.; FUNATO, M.; IDA, S.; NODA, C.; NAKAYAMA, M.; OKADA, S. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 20, n. 1, p. 10–4, 2001.

THIMME, R.; LOHMANN, V.; WEBER, F. A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. **Antiviral Research**, v. 69, n. 3, p. 129–141, 2006.

VAN REGENMORTEL, M.; FAUQUET, C.; BISHOP, D.; CASTENS, E.; ESTES, M.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, J.; MCGEOCH, D.; PRINGLE, C.; WICKNER, R. **Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. SANDIEGO: ACADEMIC PRESS, 2000.

VANDELLI, C.; RENZO, F.; ROMANO, L.; TISMINETZKY, S.; DE PALMA, M.; STROFFOLINI, T.; VENTURA, E.; ZANETTI, A. Lack of Evidence of Sexual Transmission of Hepatitis C among Monogamous Couples: Results of a 10-Year Prospective Follow-Up Study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 5, p. 855–859, 2004.

VERGNIOL J, FOUCHER J, TERREBONNE E, et al. **Noninvasive Tests for Fibrosis and Liver Stiffness Predict 5-Year Outcomes of Patients with Chronic Hepatitis C**. *Gastroenterology*. 2011 Mar 2.

VISO, A. T. R. Pathogenesis of hepatitis C: HCV consensus 2007. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 14–19, 2007.

WARD, J. W. The hidden epidemic of hepatitis C virus infection in the United States: occult transmission and burden of disease. **Topics in antiviral medicine**, v. 21, n. 1, p. 15–9, 2013.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of**

Hepatology, v. 61, n. 1, p. S58–S68, 2014.

WIESE, M.; BERR, F.; LAFRENZ, M.; PORST, H.; OESEN, U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C(genotype 1b) single-source outbreak in germany: A 20-year multicenter study. **Hepatology**, v. 32, n. 1, p. 91–96, 2000.

WILLIAMS, I. T.; BELL, B. P.; KUHNERT, W.; ALTER, M. J. Incidence and Transmission Patterns of Acute Hepatitis C in the United States, 1982-2006. **Archives of Internal Medicine**, v. 171, n. 3, p. 242, 2011.

ZAAIJER, H. L.; CUYPERS, H. T.; REESINK, H. W.; WINKEL, I. N.; GERKEN, G.; LELIE, P. N. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. **Lancet (London, England)**, v. 341, n. 8847, p. 722–4, 1993.

ZIBBELL, J. E.; ISBAL, K.; PATEL, R. C.; SURYAPRASAD, A.; SANDERS, K. J.; MOORE, L.; BLANKENSHIP, S.; WARD, J. W.; HOLTZMAN, D. **Treatment Episode Data Set -- Admissions (TEDS-A) -- Concatenated, 1992 to 2012**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6417a2.htm>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

ZIGNEGO, A. L.; FERRI, C.; PILERI, S. A.; CAINI, P.; BIANCHI, F. B.; GIOSTRA, F.; AL., et. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: A general overview and guidelines for a clinical approach. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 1, p. 2–17, 2007.

APÊNDICES

ApêndiceA -Instrumento de coleta de dados

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

- 1- Número do prontuário: _____/ Instituição: _____
- 2- Sexo: 1.() Feminino 2.() Masculino
- 3- Idade: _____ anos completos
- 4- Estado civil:
 - 1.() Solteiro
 - 2.() Casado
 - 3.() Viúvo
 - 4.() Divorciado
 - 5.() Desquitado
 - 6.() União estável
- 5- Cor ou raça:
 - 1.() Branca
 - 2.() Preta
 - 3.() Amarela
 - 4.() Parda
 - 5.() Indígena
- 6- Escolaridade:
 - 1.() Analfabeto
 - 2.() 1º grau incompleto
 - 3.() 1º grau completo
 - 4.() 2º grau incompleto
 - 5.() 2º grau completo
 - 6.() 3º grau incompleto
 - 7.() 3º grau completo
- 7- Procedência:
 - 1.() Campina Grande
 - 2.() João Pessoa

- 3.() Zona da Mata
- 4.() Agreste
- 5.() Borborema
- 6.() Sertão
- 8- Já iniciou vida sexual? 1.() Sim 2.() Não **Se não, pule para a questão 17.**
- 9- Usa preservativos nas relações sexuais?
- 1.() Sempre 2.() Às vezes 3.() Nunca
- 10- Já teve outro (s) parceiro (s), além do atual? 1.() Sim 2.() Não
- 11- Com que idade foi sua primeira relação sexual? _____ anos completos
- 12- Seu parceiro atual ou anteriores é portador de hepatite B ou C?
- 1.() Sim 2.() Não
- 13- Já teve alguma doença sexualmente transmitida? 1.() Sim 2.() Não
- 14- Com quantos parceiros do sexo oposto você se relacionou até agora? _____
- 15- Já manteve relações sexuais em troca de dinheiro ou de qualquer outra mercadoria?
- 1.() Sim 2.() Não
- 16- Já teve alguma relação sexual com pessoa do mesmo sexo? 1.() Sim 2.() Não
- 17- Qual é sua orientação sexual?
- 1.() Homossexual
- 2.() Heterossexual
- 3.() Bissexual
- 18- Já foi submetido a alguma cirurgia ou tratamento dentário cirúrgico?
- 1.() Sim 2.() Não Há quantos anos? _____ anos completos
- 19- Já precisou fazer uso de transfusão sanguínea ou de qualquer hemoderivado?
- 1.() Sim 2.() Não
- 20- Tem alguma tatuagem? Há quantos anos? _____ anos completos
- 21- Tem algum piercing? Há quantos anos? _____ anos completos
- 22- Você compartilha objetos cortantes (tesoura, lâmina de barbear, navalha, alicate) com outras pessoas em casa ou em salões de beleza (manicure, pedicure, etc)?
- 1.() Sim 2.() Não
- 23- Já foi medicado alguma vez com seringa de vidro? 1.() Sim 2.() Não
- 24- Faz ou já fez uso de drogas inaladas? 1.() Sim 2.() Não
- 25- É tabagista?
- 1.() Fumante diário
- 2.() Fumante ocasional

3.() Não é fumante

26- Faz ou já fez uso de alguma droga fumada? 1.() Sim 2.() Não

27- Faz ou já fez uso de alguma droga injetável? 1.() Sim 2.() Não

28- Você ingere alguma bebida alcóolica?

1.() Consumo moderado

2.() Beber pesado episódico

3.() Consumo pesado

4.() Não consome bebida alcóolica

29- Teve algum quadro viral com duração de mais de 7 dias, nos últimos 2 meses?

1.() Sim 2.() Não

30- Já esteve exposto (exposição habitual) a alguma dessas substâncias? Agrotóxicos, solventes, gasolina, benzeno, ou fez uso prolongado de cloroquina/SMT + TMP?

1.() Sim 2.() Não

31- Dados laboratoriais:

Genotipagem: () 1a () 1b () 2 () 3

Carga viral plasmática: _____ (escrever unidade de medida)

Exame	Resultado em:	USG realizados em:
HMG		Biometria:
ALT		
AST		
BT		Forma:
BD		
TP/AE/INR		
PT		Contorno:
PF - ALB		
GGT		
FA		Ecogenicidade:
GLIC.J		
HDL		
LDL		Vias biliares:
TRIG		
FERRITINA		
REIA		Outras observações:
CREATININA		
ELASTOGRAFIA		

Apêndice B - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

Título do Projeto: **ALTERAÇÕES PRECOSES HEMATOLÓGICAS PERIFÉRICAS E MEDULARES ASSOCIADAS AO VÍRUS DA HEPATITE C.**

Pesquisador Responsável: ROSIVANIA SILVA MOTA

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO E FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE – FCM.

Telefones para contato: (83) 3341-6996 / (83) 9.9106-8168

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar de forma voluntária e não-remunerada do projeto dessa pesquisa, de responsabilidade da pesquisadora Rosivania Silva Mota. Você está sendo convidado pelo fato de ter preenchido os critérios de inclusão para essa pesquisa (indivíduo recentemente diagnosticado ao acaso, assintomático e sem ter iniciado tratamento específico).

As alterações hematológicas periféricas e medulares associadas à hepatite C tem sido descritas em diversos estudos, sabendo-se que elas se desenvolvem tanto por agressão viral direta, quanto pela resposta imune crônica do organismo, expressando-se comumente como citopenias no sangue periférico e alterações diversas em medula óssea, tais como aplasia, displasia, siderose, hipo e hiper celularidades. Quando essas alterações são detectadas precocemente, pode-se lentificá-las e/ou compensá-las, todavia são poucos os relatos de alterações hematológicas medulares precoces em portadores crônicos assintomáticos do HCV. Esse estudo pretende descrever as alterações hematológicas medulares em indivíduos assintomáticos, triados dentre os doadores de sangue da Paraíba, infectados pelo HCV, ainda não submetidos a tratamento específico e correlacioná-las com os níveis de carga viral plasmática (alta, intermediária e baixa) e os genótipos 1a e 1b. Ele se justifica porque a detecção precoce de alterações medulares poderá auxiliar no tratamento eficaz da hepatite C, sem reduções de dosagem e nem descontinuação dos esquemas em administração, uma vez que se pode lentificá-las e/ou compensá-las com o uso de fatores estimulantes de crescimento

de colônias. Para tal análise torna-se necessária coleta de aspirado de medula óssea em osso esternal ou de crista ilíaca pósterio-superior, após anestesia local com Xilocaína.

Estetrabalhoapresenta como**objetivo geral**verificar a frequência e se existem diferenças entre alterações hematológicas medulares e periféricas, considerando as cargas virais plasmáticas alta, intermediária e baixa e os genótipos 1a e 1b em pacientes recém-diagnosticados ao acaso, assintomáticos, infectados pelo HCV na Paraíba.

Os dados serão coletados da seguinte forma:

Os exames laboratoriais e ultrassonografia serão realizados pela manhã, após jejum de 8-12 horas, em ambiente hospitalar, com coleta a vácuo de sangue venoso, após assepsia da área de punção com álcool 70%. Já a medula óssea será coletada pela própria pesquisadora no momento da aplicação do questionário, após a assinatura desse termo.

DESCONFORTOS, RISCO E BENEFÍCIOS

Não haverá risco direto para o(a) Sr.(a) que se submeter à coleta dos dados exames, uma vez que será realizado anestesia local e a punção venosa será realizada por técnica experiente, contudo, como também estará expondo elementos de caráter pessoal, poderá haver constrangimentos. Ressalta-se, entretanto, que não haverá identificação individualizada dos dados da coletividade, serão tratados com padrões éticos (conforme Resolução CNS 466/12) e científicos, sendo justificável a realização do estudo porque as informações que esse estudo pretende levantar poderá auxiliar no tratamento eficaz da hepatite C.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSINTÊNCIA

A participação do Sr.(a) nessa pesquisa não implica necessidade de acompanhamento e/ou assistência posterior por parte da pesquisadora, uma vez que continuará em acompanhamento com hepatologistas de serviços especializados, tendo em vista que apresenta pesquisa com finalidade de identificar fatores gerais da população estudada em relação a infecção. Além disso, como o instrumento de coleta de dados não há dados específicos de identificação do Sr.(a), a exemplo de nome, CPF, RG, etc., não será possível identificá-lo posteriormente de forma individualizada.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE

SIGILO

O Sr.(a) será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e a qualquer etapa do estudo. O Sr. (a) é livre para recusar-

se participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de prestação de serviços aqui no estabelecimento. Os pesquisadores irão tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa permanecerão confidenciais podendo ser utilizados apenas para a execução dessa pesquisa. Você não será citado(a) nominalmente ou por qualquer outro meio, que o identifique individualmente, em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado, assinada pelo Sr.(a) na última folha e rubricada nas demais, ficará sob a responsabilidade do pesquisador responsável e outra será fornecida ao(a) Sr.(a).

Eu, _____, RG nº _____
 declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Campina Grande, _____ de _____ de _____



 Nome e assinatura do paciente

 Testemunha

Impressão digital

Contato do pesquisador:

Rosivania Silva Mota
 Instituto do Fígado e do Sangue - IFS
 Telefone: 83-3341-6996
 Ifs2000@uol.com.br

Caso o participante deseje tirar dúvidas com relação aos aspectos éticos procurar o Comitê de ética em Pesquisa:

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande – FCM
 Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 – Itararé – CEP 58.411-020
 Campina Grande – PB
 Telefone: 83-2101-8857 / 98105-3641
cep@cesed.br

Apêndice C - Artigo científico

Revista – Acta Haematologica – <https://www.karger.com/Journal/Guidelines/223829>

Alterações hematológicas periféricas e medulares em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, assintomáticos de doença hepática.

Rosivania Silva Mota¹; Raíssa Mota Leite Diniz²; Juliana Prado Gonçalves³; Viviane Martha Santos de Moraes³; Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho^{3,4}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Medicina Tropical, Recife, PE, Brasil

²Faculdade de Ciências Médicas (FCM/FACISA), Campina Grande, PB, Brasil

³Universidade Federal de Pernambuco, setor de virologia, Laboratório de imunopatologia Keizo Asami, Recife, PE, Brasil

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Recife, PE, Brasil

*Correspondência: rosivania.mota@inss.gov.br / ifs2000@uol.com.br

Rosivania Silva Mota

Instituto do Fígado e do Sangue

Depto de Hematologia, Rua Nilo Peçanha, 538. CEP: 58400-515, Campina Grande - PB

Resumo

Existem muitos relatos de alterações hematológicas medulares e em sangue periférico em portadores crônicos do HCV, entretanto com pacientes infectados e sintomáticos de doença hepática e/ou hematológica. Os objetivos deste estudo foram descrever as alterações hematológicas periféricas e medulares em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) e assintomáticos de doenças hepática e hematológica, ainda não submetidos a tratamento específico e correlacioná-las com a carga viral plasmática, genótipos e grau de fibrose hepática. Foram selecionados pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 a 60 anos, atendidos nos ambulatorios de hepatologia e infectologia do Estado da Paraíba no período de 01/2016 a 03/2017. Foi realizada uma entrevista para obtenção de dados sócios demográficos, os clínico-laboratoriais foram obtidos a partir dos prontuários e realizada a coleta do mielograma. Participaram do estudo 30 pacientes com média de idade de 43,93, sendo 60,0% mulheres. A frequência das alterações hematológicas periféricas foi de 20,0% e das alterações medulares de 90,0%, observou-se associação entre os indivíduos com alterações hematológicas periféricas e os graus de fibrose ($p=0,014$), sem associação com a carga viral e os genótipos. O genótipo 1 foi presente em 80,0% dos pacientes e alta viremia em 64,4% e em 66,7% com graus iniciais de fibrose hepática de F0 a F2. 80,0% dos pacientes não tinham alterações no exame sanguíneo periférico, entretanto na análise do mielograma 56,7% apresentavam algum tipo de alteração na celularidade geral e/ou específica por série, 83,3% tinham alteração de maturação das linhagens celulares, predominando a desproporção maturativa núcleo citoplasmática e os retardos maturativos. Trata-se de estudo pioneiro com pacientes assintomáticos de doença hepática, infectados pelo HCV, assim apesar de baixa a frequência das alterações periféricas, houve associação com os graus de fibrose e por outro lado as alterações hematológicas medulares foram altas, mas sem associação com a carga viral, os genótipos e os graus de fibrose, ressalta-se a importância do acompanhamento hematológico desses pacientes, uma vez que podem se beneficiar com uma abordagem mais precoce de sua doença hepática com o tratamento específico, bloqueando a progressão desses distúrbios hematológicos antes de tornarem-se irreversíveis.

Palavras-chave: Alterações hematológicas periféricas e medulares, hepatite C, frequência, genótipos, carga viral.

Introdução

Pesquisas têm descrito alterações hematológicas medulares e periféricas associadas à hepatite C [1–3]. Elas se desenvolvem tanto por agressão viral direta, quanto pela resposta imune crônica do organismo, expressando-se comumente como citopenias no sangue periférico[4] e alterações em medula óssea, como aplasia, displasia, siderose, hipo/hipercelularidade total ou setorial[3].

Em pacientes monoinfectados pelo vírus da hepatite C (HCV), submetidos à biópsia de medula óssea devido à presença de alguma citopenia, foi demonstrado alterações em medula óssea sem correlação com o uso de antivirais, sugerindo que a disfunção medular é independente do estágio ou da extensão da fibrose hepática[2]. Na hepatite C crônica,

sintomática, podem ocorrer alterações medulares e periféricas importantes [5]. Além disso, foi demonstrado que o genótipo 1b é o maior fator de risco associado à presença de cirrose e/ou de carcinoma hepatocelular. No entanto, não existem pesquisas que permitam estender essa mesma relação às alterações em medula óssea[6,7].

As alterações hematológicas periféricas e medulares podem influenciar na adesão e no tratamento para hepatite C, comprometendo seu prognóstico. Assim, a detecção precoce dessas alterações pode auxiliar no tratamento eficaz da hepatite C, sem reduções de dosagem e nem descontinuação dos esquemas em administração, podendo lentificá-las/ou compensá-las com o uso de fatores estimulantes de crescimento de colônias, todavia a sua eficácia depende do prévio conhecimento da celularidade e da normopoiesemedulares[1]. O presente estudo descreve alterações hematológicas periféricas e medulares, em indivíduos infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática, sem tratamento específico associando com genótipo, carga viral e grau de fibrose.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo e população da pesquisa

Trata-se de estudo descritivo analítico envolvendo pacientes de ambos os sexos, de 18 a 60 anos, atendidos em ambulatórios de hepatologia e infectologia, na Paraíba. Foram excluídos pacientes com sintomas de doença hepática e hematológica avançada, indivíduos co-infectados com HBV, HIV e/ou HTLV I e II, mulheres grávidas, indivíduos com história clínica de quadro viral agudo com mais de sete dias de duração nos últimos 2 meses, indivíduos com insuficiência renal crônica (IRC) ou doença equivalente que conduza a IRC, indivíduos tratados previamente para o HCV. Os pacientes foram entrevistados, assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e em seguida realizado o mielograma e a coleta sanguínea. Os dados da carga viral, genótipo, grau de fibrose hepática, hemograma, exames bioquímicos e sorológicos, ultrassonografia e elastografia hepáticos foram coletados a partir dos prontuários.

Coleta de medula óssea

O aspirado de medula óssea foi realizado pela própria pesquisadora, em osso esternal ou em crista ilíaca pósterio-superior, com agulha de Rosenthal, em sala de pequenas cirurgias ou no próprio ambulatório. As lâminas foram coradas e analisadas pela própria pesquisadora.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram analisadas através de frequências absolutas e percentuais e as numéricas pela média e desvio padrão. Para associação entre duas variáveis numéricas foram utilizados os testes Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher. O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS na versão 23. A margem de erro dos testes foi de 5%.

Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande – FCM/CESED sob o número **CAAE**: 51675715.3.0000.5175.

Resultados

Este estudo envolveu 30 pacientes, selecionados por amostra de conveniência à medida que se apresentavam nos ambulatorios especializados e que obedeciam aos critérios determinados na pesquisa. Os dados sócios demográficos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos dados sócios demográficos dos pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	n	%
Sexo		
Masculino	12	40,0
Feminino	18	60,0
Faixa etária (anos)		
25 a 49	14	46,7
50 a 59	16	53,3
Estado civil		
Solteiro	6	20,0
Casado	14	46,7
Viúvo	1	3,3
Divorciado	4	13,3
União estável	5	16,7
Etnia		
Branca	2	6,7
Preta	4	13,3
Parda	24	80,0
Escolaridade		
Analfabeto	1	3,3
1º grau incompleto	8	26,7
2º grau completo	11	36,7
3º grau incompleto	10	33,3

A frequência do genótipo, carga viral e grau de fibrose hepática, no momento da coleta da medula óssea, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Frequência do genótipo, carga viral e grau de fibrose em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variáveis	n	%
Genótipo		
1	1	3,3
1A	6	20,0
1B	17	56,7
2	2	6,7
3	4	13,3
Carga viral		
> 600.000	16	53,3
Até 600.000	14	46,7
Classificação elastográfica de fibrose hepática		
F0	6	20,0
F1	9	30,0
F2	5	16,7
F3	6	20,0
F4	4	13,3

A figura 1 mostra a distribuição das alterações hematológicas periféricas e na tabela 3 está apresentada a distribuição das alterações medulares dos pacientes infectados pelo HCV, sem sintomas de doença hepática avançada.

Figura 1 – Distribuição das alterações periféricas em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

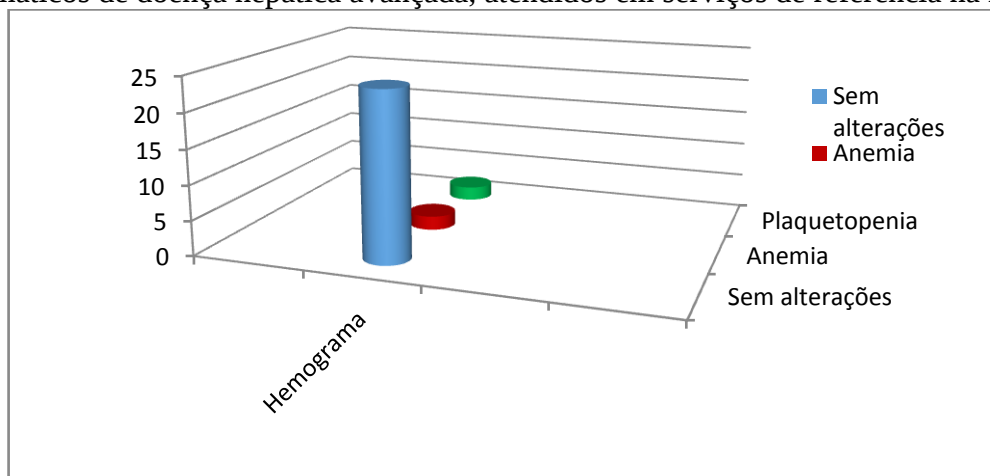


Tabela 3 – Distribuição das alterações medulares em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variáveis	n	%
Alterações de celularidade		
Normocelular	20	66,7
Hipercelular	3	10,0
Hipocelular	7	23,3
Alterações de celularidade específica		
<i>Eritrocitrica</i>		
Normocelular	28	93,3
Hipercelular	2	6,7
<i>Granulocitica</i>		
Normocelular	29	96,7
Hipercelular	1	3,3
<i>Megacariotica</i>		
Normocelular	21	70,0
Hipercelular	8	26,7
Hipocelular	1	3,3
Alterações de maturação celular *		
Diseritropoiese	12	40,0
Disgranulocitopoiese	8	26,7
Dismegacariocitopoiese	10	33,3
Sem alteração	4	13,3

*um paciente pode apresentar mais de uma alteração, podendo a soma das frequências ser superior ao tamanho da amostra.

As associações das alterações hematológicas periféricas com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática estão apresentadas na tabela 4 e as alterações medulares quanto a celularidade e maturação são mostradas na tabela 5 e tabela 6.

Tabela 4 – Associação das alterações periféricas com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	Alterações periféricas				p*
	Presente		Ausente		
	n	%	n	%	
Carga viral					1,000
> 600.000	3	50,0	13	54,2	
Até 600.00	3	50,0	11	45,8	
Genótipo					0,066
1A	1	16,7	5	20,8	
1B	2	33,3	16	66,7	
2	0	0,0	2	8,3	
3	3	50,0	1	4,2	
Grau da fibrose hepática					0,014
F0	1	16,7	5	20,8	
F1	0	0,0	9	37,5	
F2	0	0,0	5	20,8	
F3	2	33,3	4	16,7	
F4	3	50,0	1	4,2	

*p obtido através do teste Exato de Fisher

Foi observado que 50% dos pacientes apresentavam relação entre as alterações periféricas e as respectivas séries medulares, sugerindo comprometimento na hematopoiese medular.

Tabela 5 – Associação da celularidade medular com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	Alterações na celularidade				p
	Presente		Ausente		
	n	%	n	%	
Carga viral					0,961*
> 600.000	9	52,9	7	53,8	
Até 600.00	8	47,1	6	46,2	
Genótipo					0,870**
1A	3	17,6	3	23,1	
1B	10	58,8	8	61,5	
2	1	5,9	1	7,7	
3	3	17,6	1	7,7	
Grau da fibrose hepática					0,900**
F0	4	23,5	2	15,4	
F1	4	23,5	5	38,5	
F2	3	17,6	2	15,4	
F3	3	17,6	3	23,1	
F4	3	17,6	1	7,7	

* p obtido através do teste Qui-quadrado de Pearson. ** p obtido através do teste Exato de Fisher

Tabela 6 – Associação da maturação celular na medula com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática em pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos de doença hepática avançada, atendidos em serviços de referência na Paraíba

Variável	Alterações na maturação celular				p*
	Presente		Ausente		
	n	%	n	%	
Carga viral					0,642**
> 600.000	14	56,0	2	40,0	
Até 600.000	11	44,0	3	60,0	
Genótipo					1,000**
1A	5	20,0	1	20,0	
1B	15	60,0	3	60,0	
2	2	8,0	-	-	
3	3	12,0	1	20,0	
Grau da fibrose hepática					0,219**
F0	6	24,0	-	-	
F1	7	28,0	2	40,0	
F2	4	16,0	1	20,0	
F3	6	24,0	-	-	
F4	2	8,0	2	40,0	

* p obtido através do teste Exato de Fisher

Dos 25 pacientes com alterações medulares, uma apresentava alteração nas três séries (eritrocítica, granulocítica e megacariocítica), tendo sido confirmado o diagnóstico de mielodisplasia e três apresentavam alterações em duas séries concomitantes. Entretanto não

houve associação das alterações de celularidade e maturação com carga viral, genótipo e grau de fibrose.

Discussão

Existem muitos relatos de alterações hematológicas medulares e em sangue periférico em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), sintomáticos de doença hepática e/ou hematológica. Este é um estudo transversal, pioneiro no Brasil, a estimar as frequências de alterações hematológicas periféricas e medulares em indivíduos infectados pelo HCV, entretanto quando ainda assintomáticos de doenças hepática e hematológica, não submetidos a tratamento específico prévio, associando-as com carga viral, genótipo e grau de fibrose hepática.

A população estudada foi composta em sua maioria por pacientes do sexo feminino, talvez por maior interesse das mulheres em procurar assistência médica numa fase ainda assintomática da doença hepática e por sua detecção mais precoce nos testes de triagem do pré-natal. Por outro lado, nos estudos envolvendo alterações hematológicas em pacientes com doença hepática avançada, o predomínio foi maior em indivíduos do sexo masculino, com uma razão homem/mulher de 2,0[5,7,8], possivelmente porque a ingestão alcóolica e a doença metabólica gordurosa sejam mais prevalente no sexo masculino, fatores estes sabidamente aceleradores da progressão da doença hepática [9]. A média de idade da pesquisa foi similar aos outros estudos na população de infectados pelo HCV [5,7–9]. Seguindo o padrão de distribuição dos genótipos nas Américas e no Brasil [10–13], neste estudo a maior prevalência foi dos genótipos 1 e 3. Na análise da distribuição dos genótipos com fatores biológicos como idade e sexo, não houve diferença significativa quando comparados com outros estudos brasileiros[13]. Entretanto observou-se maior frequência dos genótipos 2 e 3 em indivíduos com faixa etária menor que 40 anos, corroborando com estudos de MOATTER et al., (2002)[7] e BELLENTANI et al., (1999)[6] que mostraram maior frequência do genótipo 3 em indivíduos adultos jovens.

Alterações hematológicas estão entre as mais comuns manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV, no estudo de KLCO et al., (2010)[2], os pacientes foram encaminhados para análise da medula óssea devido acitopenias periféricas, predominando a bicitopenia. Por outro lado, ANWAR et al., (2012)[5] mostraram o predomínio depancitopenia, talvez por nesse último estudo os pacientes terem maior grau de lesão hepática. Pacientes infectados pelo HCV podem desenvolver alterações em sangue periférico, as quais são comumente atribuídas ao hiperesplenismo, terapia antiviral, diminuição dos

níveis de trombopoetina e/ou mecanismos imunes [14,15]. Em nossa pesquisa os pacientes desconheciam quaisquer doenças hematológicas prévias, contudo foram observadas alterações hematológicas periféricas, notadamente a plaquetopenia, seguindo o padrão descrito na literatura[14,16].

A patogênese da trombocitopenia entre os pacientes infectados pelo HCV é multifatorial, as possíveis causas incluem: sequestro esplênico secundário a hipertensão portal e esplenomegalia com hiperesplenismo, supressão direta da medula óssea pelo HCV ou pelo tratamento antiviral, destruição imune das plaquetas e produção deficiente de trombopoetina devido à lesão hepatocelular[17]. Este estudo não se propôs a investigar as causas das citopenias, entretanto a associação entre as alterações hematológicas em sangue periférico e grau de fibrose, corrobora com outros estudos que mostraram maior prevalência de citopenias em pacientes com doença hepática avançada (pacientes cirróticos e/ou com grau de fibrose F4), onde a intensidade da plaquetopenia reflete a gravidade da lesão hepática[18]. Em relação à carga viral e genótipo não foi observada associação, entretanto não existem dados na literatura para comparação.

Nos pacientes com alterações medulares, não foi observada associação da celularidade e maturação com carga viral, genótipo e grau de fibrose. Contrariamente a pesquisa de ABOU EL AZM et al. (2012) que correlacionaram alta viremia com a presença de alterações em medula óssea, dado não corroborado por este estudo[8].

A maior frequência de alterações hematológicas medulares nos pacientes deste estudo, com predomínio de alterações de maturação, notadamente a desproporção maturativa núcleo citoplasmática e os retardos maturativos, difere dos resultados de ASFOUR et al. (2013) com pacientes portadores de doença hepática avançada, que apresentavam hiperplasmademedular[3]. Essas alterações de maturação podem ser secundárias a diversos fatores além da ação direta do vírus e/ou da resposta imune do hospedeiro, dentre elas: deficiências de ferro, ácido fólico e vitamina B12, como já relatado por ANWAR et al. (2012)[5]. Foi observado que 50% dos pacientes apresentavam relação entre as alterações periféricas e as respectivas séries medulares, sugerindo comprometimento na hematopoiese medular.

Apesar da população deste estudo ser constituída por pacientes infectados pelo HCV, assintomáticos, sem doença hepática avançada, foram encontradas alterações hematológicas periféricas, predominando a plaquetopenia, além de alta frequência de alterações medulares, com comprometimento da maturação celular. Entretanto, não houve associação das alterações hematológicas medulares com carga viral, genótipo e grau de fibrose, porém foram

encontradas alterações hematológicas periféricas associadas com grau de fibrose. Diante do exposto, a identificação e a compreensão sobre a instalação dos distúrbios hematológicos associados ao HCV, bem como do seu diagnóstico torna-se relevante, uma vez que esses pacientes podem beneficiar-se de uma abordagem mais precoce de sua doença e de tratamento específico, mesmo antes de se enquadrarem nos critérios hepáticos determinados pelo Ministério da Saúde, bloqueando a progressão destes distúrbios antes que se tornem irreversíveis. Portanto, sugerimos acompanhamento hematológico regular em pacientes infectados pelo HCV e assintomáticos de doença hepática.

Conflitos de interesses

Os autores declaram que não tem conflitos de interesses.

Referências

- 1 Dieterich DT, Spivak JL: Hematologic Disorders Associated with Hepatitis C Virus Infection and Their Management. *Clin Infect Dis* 2003;37:533–541.
- 2 Klco JM, Geng B, Brunt EM, Hassan A, Nguyen T-D, Kreisel FH, et al.: Bone marrow biopsy in patients with hepatitis C virus infection: Spectrum of findings and diagnostic utility. *Am J Hematol* 2010;85:106–110.
- 3 Asfour, Ayoub MS, Magid NAA, Elsayharty AAI: Evaluation of bone marrow examination in patients with hepatitis C virus infection. *Egypt J Haematol* 2013;38:13.
- 4 Streiff M, Mehta S, Thomas DL: Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;35:947–952.
- 5 Anwar B, Hassan K, Asif N: Diagnostic Utility of Bone Marrow Examination in Chronic Liver Disease Patients Referred For Evaluation of Hematological Derangements. *Int J Pathol* 2012;10:13–16.
- 6 Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Crocè LS, Mazzoran L, et al.: Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut* 1999;44:874–880.
- 7 Moatter T, Hussainy AS, Hamid S, Ahmad Z, Siddiqui S: Comparative analysis of viral titers and histologic features of Pakistani patients infected with hepatitis C virus type 3. *Int J Infect Dis* 2002 [cited 2017 Aug 12];6:272–6.
- 8 Abou El Azm AR, El-Bate H, Abo-Ali L, Mansour N, Ghoraba H, Salem ML: Correlation of viral load with bone marrow and hematological changes in pale patients with chronic hepatitis C virus. *Arch Virol* 2012;157:1579–1586.
- 9 Mincis M, Mincis R: Esteatose e esteato-hepatite não alcoólicas; in : *Gastroenterologia & Hepatologia*, ed 4. São Paulo, Lemos Editorial, 2011, pp 873–882.
- 10 Lopes CLR, Teles SA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro ARC, et al.: Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. *Rev Saude Publica* 2009;43:43–50.
- 11 Duarte CAB: Detecção e quantificação do vírus da Hepatite C através de RT-PCR em tempo - real 2006 [cited 2017 Aug 13];Available from: <http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/6246>
- 12 Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al.:

- Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2005;38:41–9.
- 13 Silva LK, Silva MBS, Rodart IF, Lopes GB, Costa FQ, Melo ME, et al.: Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 2006;39:595–602.
 - 14 Afdhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al.: Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* 2008;48:1000–1007.
 - 15 Zhang W, Nardi MA, Borkowsky W, Li Z, Karparkin S: Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* 2009;113:4086–4093.
 - 16 Pawlotsky J-M: Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96–102.
 - 17 WEKSLER BB: Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:13–19.
 - 18 Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D: Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3:3–14.

Apêndice D - Scientificarticle

Revista – Acta Haematologica – <https://www.karger.com/Journal/Guidelines/223829>

Peripheral and medullary hematological changes in patients infected with hepatitis C virus, asymptomatic of liver disease.

Rosivania Silva Mota¹; Raíssa Mota Leite Diniz²; Juliana Prado Gonçalves³; Viviane Martha Santos de Moraes³; Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho^{3,4}

¹Post-Graduation in Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Graduation in Medicine, Faculty of Medical Sciences(FCM/FACISA), Campina Grande, PB. Brazil.

³Virology Sector, KeizoAsami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. .

⁴Department of Physiology and Pharmacology, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

* Corresponding author: rosivania.mota@inss.gov.br / ifs2000@uol.com.br

Rosivania Silva Mota

Instituto do Fígado e do Sangue

Dept. of Hematology, NiloPeçanha St, 538.ZIP CODE: 58400-515. Campina Grande – PB, Brazil.

ABSTRACT

There are many reports of hematological changes in peripheral blood and bone marrow in chronic HCV infected patients, however, the studies carried out so far have been aimed at patients infected and symptomatic of liver and/or hematological disease who were referred to tertiary medical care with cytopenias to be investigated. No study was found to address the evaluation of bone marrow changes, at an earlier stage of infection, with patients still asymptomatic from a hematological and hepatic point of view. The aims of this study were to describe hematological changes in peripheral blood and bone marrow in infected individuals with hepatitis C virus infection and asymptomatic of hepatic and hematological diseases, not yet submitted to specific treatment and correlate them with viral load, genotype and degree of hepatic fibrosis. This is an analytical descriptive study, in which 30 patients of both sexes, aged between 18 and 60 years old, attended at the outpatient clinics of hepatology and infectology of the State of Paraíba were selected from 2016, January to 2017, March. An interview was carried out to obtain the socio-demographic data, the clinical-laboratory ones were obtained from the medical records and the bone marrow aspirate was collected. The mean age was 43.93, with 60.0% women. The frequency of peripheral hematological alterations was 20.0% and the medullary changes of 90.0%, an association was observed between individuals with peripheral hematological alterations and degree of fibrosis ($p=0,014$), without association with viral load and genotype. Genotype 1 was present in 80.0% of the patients and high viremia in 64.4% and 66.7% with initial degrees of hepatic fibrosis from F0 to F2. 80.0% of the patients had no alterations in the peripheral blood test; however, in the analysis of the myelogram 56.7% presented some type of alteration in general and / or specific series cellularity, 83, 3% had maturational alterations of the cell lineages, predominating maturative nucleus cytoplasmatic disproportion and maturative delays. This is a pioneer study with asymptomatic patients of liver disease, infected with HCV, thus, despite the low frequency of peripheral alterations was low, there was an association with the degree of fibrosis and, on the other hand, the hematological changes in bone marrow were high but with no association with viral load, genotype and degree of fibrosis, however the importance of hematologic follow-up of these patients is emphasized, since they may benefit from an earlier approach to their liver disease with specific treatment, blocking the progression of these hematological disorders before they become irreversible.

Keywords: Bone marrow. Peripheral blood. Changes. Hepatitis C. Frequency. Viral load. Genotype. Hepatic fibrosis.

Introduction

Researches have described bone marrow and peripheral hematological changes associated with hepatitis C [1-3]. They develop both by direct viral aggression and by the chronic immune response of the organism, commonly expressed as peripheral blood cytopenias [4] and bone marrow changes, such as aplasia, dysplasia, siderosis, total or sectoral hypo / hypercellularity [3].

In patients monoinfected with hepatitis C virus (HCV) who underwent bone marrow biopsy due to the presence of some cytopenia, bone marrow changes without correlation with the use of antivirals have been demonstrated, suggesting that the medullary dysfunction is independent of the stage or extension of hepatic fibrosis [2]. In chronic, symptomatic hepatitis C, important medullary and peripheral changes may occur [5]. In addition, genotype 1b has been shown to be the major risk factor associated with the presence of cirrhosis and / or hepatocellular carcinoma. However, there are no studies that extend the same relationship to changes in bone marrow [6,7].

Peripheral and medullary hematological alterations may influence patient compliance and the treatment, itself, for hepatitis C, compromising its prognosis. Thus, early detection of these changes may help in the effective management of hepatitis C, without dose reductions or discontinuation of administration regimens, and may either slow them down or compensate them with the use of colony-stimulating factors, however its efficacy depends on the prior knowledge of cellularity and medullary normopoiesis [1]. The present study describes peripheral and medullary hematological alterations in HCV infected individuals, asymptomatic of liver disease, without specific treatment associated with genotype, viral load and degree of fibrosis. The present study describes peripheral and medullary hematological alterations in HCV infected individuals, asymptomatic of liver disease, without specific treatment associating them with genotype, viral load and degree of fibrosis.

Materials and methods

Study design and research population

This is an analytical descriptive study involving patients of both sexes, from 18 to 60 years of age, attending outpatient clinics in hepatology and infectology in Paraíba. Excluded patients with symptoms of advanced hepatic and/or hematological disease, individuals co-

infected with HBV, HIV and / or HTLV I and II, pregnant women, individuals with a history of acute viral disease lasting more than seven days in the last 2 months , individuals with chronic renal failure (CRF) or equivalent disease leading to CRF, subjects previously treated for HCV. The patients were interviewed, signed the informed consent form and then collected myelogram and blood tests. Data on viral load, genotype, liver fibrosis grade, blood count, biochemical and serological tests, ultrasound and hepatic elastography were collected from the medical records.

Bone marrow collection

The bone marrow aspirate was performed by the researcher herself, in sternal bone or in the post superior iliac bone crest, with Rosenthal's needle, in a small surgery room or in the outpatient clinic itself. The slides were stained and analyzed by the researcher herself.

Statistical analysis

The categorical variables were analyzed by absolute frequencies and percentage and the numerical ones by mean and standard deviation. For the association between two numerical variables Pearson's Chi-square tests or Fisher's exact test were used. The statistical program used to enter the data and obtain the statistical calculations was the IBM SPSS in version 23. The margin of error of the tests was of 5%.

Ethical Considerations

The research was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences in Campina Grande (FCM / CESED) under the number **CAAE:** 51675715.3.0000.5175.

Results

This study involved 30 patients, selected by convenience sample as they were present in the specialized outpatient clinics and who obeyed the criteria determined in the research. The demographic data are shown in table 1.

Table 1 – Distribution of demographic data of HCV-infected patients, asymptomatic of advanced liver disease attended at reference services in Paraíba

Variable	N°	%
Sex		
Male	12	40,0
Female	18	60,0
Age group (in years)		
25 a 49	14	46,7
50 a 59	16	53,3
Marital status		
Single	6	20,0
Married	14	46,7
Widower	1	3,3
Divorced	4	13,3
Stableunion	5	16,7
Ethnicity		
White	2	6,7
Black	4	13,3
Brown	24	80,0
Education		
Illiterate	1	3,3
Incomplete 1st grade	8	26,7
2nd grade completed	11	36,7
Incomplete 3rd grade	10	33,3

The frequencies of the genotype, viral load and degree of hepatic fibrosis at the time of bone marrow aspirate are shown in table 2.

Table 2 – Frequency of genotype, viral load and degree of fibrosis in patients infected with HCV, asymptomatic of advanced liver disease attended at reference services in Paraíba

Variáveis	Nº	%
Genotype		
1	1	3,3
1A	6	20,0
1B	17	56,7
2	2	6,7
3	4	13,3
Viral load (unit/ml)		
> 600.000	16	53,3
Até 600.000	14	46,7
Elastographic classification of hepatic fibrosis		
F0	6	20,0
F1	9	30,0
F2	5	16,7
F3	6	20,0
F4	4	13,3

Figure 1 shows the distribution of peripheral hematological changes and Table 3 shows the distribution of the medullary changes in patients infected with HCV, without symptoms of advanced liver disease.

Figure 1 – Distribution of peripheral blood alterations in HCV infected patients, asymptomatic of advanced liver disease attended at reference services in Paraíba

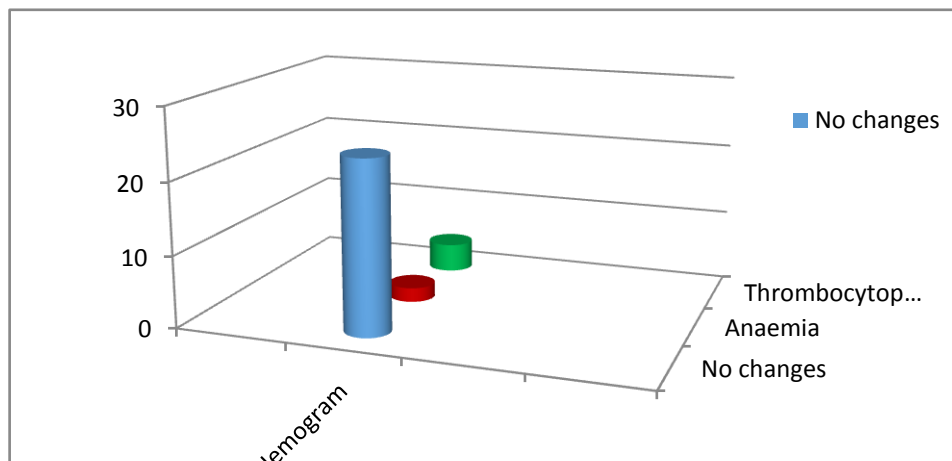


Table 3 – Distribution of bone marrow changes in patients infected with HCV, asymptomatic of advanced liver disease attended at reference services in Paraíba

Variable	N°	%
Cellularityalterations		
Normocellular	20	66,7
Hypercellular	3	10,0
HipoHypercellular	7	23,3
Alterations of cellularity by lineage		
<i>Erythrocytic</i>		
Normocellular	28	93,3
Hypercellular	2	6,7
<i>Granulocytic</i>		
Normocellular	29	96,7
Hypercellular	1	3,3
<i>Megakaryocytic</i>		
Normocellular	21	70,0
Hypercellular	8	26,7
Hipocellular	1	3,3
Changes in cellmaturation*		
Diseritropoiese	12	40,0
Disgranulocytopoiesis	8	26,7
Dismegacariocitopoiese	10	33,3
No change	4	13,3

* a patient may present more than one alteration, thus the sum of the frequencies may be larger than the sample size.

Associations between peripheral hematological changes with viral load, genotype, and degree of hepatic fibrosis are presented in Table 4 and the medullary changes in cellularity and maturation are shown in Table 5 and Table 6.

Table 4 – Association of peripheral blood alterations with viral load, genotype and degree of hepatic fibrosis in patients infected with HCV, asymptomatic of advanced liver disease attended at reference services in Paraíba

Variable	Peripheral blood alterations				p*
	Present		Absent		
	N°	%	N°	%	
Viral load (unit/ml)					1,000
> 600.000	3	50,0	13	54,2	
Até 600.00	3	50,0	11	45,8	
Genotype					0,066
1A	1	16,7	5	20,8	
1B	2	33,3	16	66,7	
2	0	0,0	2	8,3	
3	3	50,0	1	4,2	
Degree of hepatic fibrosis					0,014
F0	1	16,7	5	20,8	
F1	0	0,0	9	37,5	
F2	0	0,0	5	20,8	
F3	2	33,3	4	16,7	
F4	3	50,0	1	4,2	

**p* obtained through Fisher's exact test

It was observed that 50% of the patients presented positive relation between the peripheral blood alterations and their respective medullary lineage, suggesting that the bone marrow was compromised.

Table 5 – Association of medullar cellularity alterations with viral load, genotype and degree of hepatic fibrosis in patients infected with HCV, asymptomatic of advanced liver disease, attended at reference services in Paraíba

Variable	Medullarcellularityalterations				p
	Present		Absent		
	N°	%	N°	%	
Viral load (unit/ml)					0,961*
> 600.000	9	52,9	7	53,8	
Até 600.00	8	47,1	6	46,2	
Genotype					0,870**
1A	3	17,6	3	23,1	
1B	10	58,8	8	61,5	
2	1	5,9	1	7,7	
3	3	17,6	1	7,7	
Degreeofhepaticfibrosis					0,900**
F0	4	23,5	2	15,4	
F1	4	23,5	5	38,5	
F2	3	17,6	2	15,4	
F3	3	17,6	3	23,1	
F4	3	17,6	1	7,7	

p* obtained through the Pearson Chi-square test. *p* obtained through Fisher's exact test.

Table 6 – Association of medullar cell maturation alterations with viral load, genotype and degree of liver fibrosis in patients infected with HCV, asymptomatic of advanced liver disease attended at reference services in Paraíba

Variable	Medullar cell maturation alterations				p*
	Present		Absent		
	N°	%	N°	%	
Viral load (unit/ml)					0,642**
> 600.000	14	56,0	2	40,0	
Até 600.000	11	44,0	3	60,0	
Genotype					1,000**
1A	5	20,0	1	20,0	
1B	15	60,0	3	60,0	
2	2	8,0	-	-	
3	3	12,0	1	20,0	
Degree of hepatic fibrosis					0,219**
F0	6	24,0	-	-	
F1	7	28,0	2	40,0	
F2	4	16,0	1	20,0	
F3	6	24,0	-	-	
F4	2	8,0	2	40,0	

**p* obtained through Fisher's exact test

Of the 25 patients with medullary alterations, one had alterations in all the three lineages (erythrocytic, granulocytic and megakaryocytic). Myelodysplasia was confirmed and

three presented alterations in two concomitant lineage. However, there was no association of cellularity and maturational changes with viral load, genotype and degree of fibrosis.

Discussion

There are many reports of hematological changes either in bone marrow and peripheral blood in patients infected with hepatitis C virus (HCV) and symptomatic of liver and / or haematological disease. This is a cross-sectional study, pioneer in Brazil, which is proposed to estimate the frequencies of peripheral and medullary hematological changes in HCV infected individuals. However, when asymptomatic of hepatic and hematological diseases, who were not submitted to previous specific treatment, associating them with viral load, genotype and degree of liver fibrosis.

The studied population consisted mostly of female patients, perhaps because of the greater interest of women in seeking medical care at an asymptomatic stage of liver disease and their earlier detection in pregnancy screening tests. On the other hand, in studies involving hematological alterations in patients with advanced liver disease, the prevalence was greater in males, with a male / female ratio of 2.0 [5,7,8], possibly because alcohol intake and fatty metabolic disease are more prevalent in males, factors known to be accelerator of liver disease progression [9]. The mean age of the study was similar to the other studies in the HCV-infected population [5,7-9]. Following the pattern of distribution of genotypes in the Americas and Brazil [10-13], in this study the highest prevalence was of genotypes 1 and 3. Analysing the distribution of genotypes with biological factors such as age and sex, there was no significant difference when compared with other Brazilian studies [13]. However, it was observed a higher frequency of genotypes 2 and 3 in individuals younger than 40 years, corroborating the studies of MOATTER et al. (2002) [7] and BELLENTANI et al. (1999) [6] which showed higher frequency of genotype 3 in young adult subjects.

Hematologic changes are among the most common extrahepatic manifestations of HCV infection, in the study of KLCO et al. (2010) [2], patients were referred for analysis of bone marrow due to peripheral cytopenias, predominating bicytopenia. On the other hand, ANWAR et al. (2012) [5] showed the predominance of pancytopenia, perhaps because in the latter study the patients had a higher degree of liver damage. Patients infected with HCV may develop peripheral blood disorders, which are commonly attributed to hypersplenism, antiviral therapy, decreased levels of thrombopoietin and / or immune mechanisms [14,15]. In our study, patients were unaware of any previous hematological diseases, however, peripheral

hematological abnormalities, notably thrombocytopenia, were observed following the pattern described in the literature [14,16].

The pathogenesis of thrombocytopenia among HCV-infected patients is multifactorial, the possible causes include: splenic sequestration secondary to portal hypertension and splenomegaly with hypersplenism, direct suppression of bone marrow by HCV or antiviral treatment, immune destruction of platelets and poor production of thrombopoietin due to hepatocellular injury [17]. This study did not attempt to investigate the causes of cytopenias. However, the existence of an association between hematological changes in peripheral blood and degree of fibrosis corroborates other studies showing a higher prevalence of cytopenias in patients with advanced liver disease (cirrhotic and / or with F4 degree of fibrosis), in whom the intensity of the thrombocytopenia reflects the severity of the hepatic injury [18]. Regarding to viral load and genotype, no association was observed, however, there are no data in the literature for comparison.

In the patients with alterations in bone marrow, no association between cellularity and maturation changes with viral load, genotype and degree of fibrosis were observed. In opposition to the research of ABOU EL AZM et al. (2012) who correlated high viremia with the presence of changes in bone marrow, result not corroborated by this study [8].

The higher frequency of bone marrow changes in the patients of this study, with predominance of maturation alterations, notably maturative cytoplasmic and nucleus disproportion and maturative delays, differs from the results of ASFOUR et al. (2013) in patients with advanced liver disease who presented with medullary hypercellularity [3]. These changes in maturation may also be secondary to several factors besides the direct action of the virus and / or the immune response of the host, among them: deficiencies of iron, folate and B12 vitamin, as already reported by ANWAR et al. (2012) [5]. It was observed that 50% of the patients presented a relation between the peripheral alterations and the respective medullary lineages, suggesting involvement in hematopoiesis.

Although the population of this study consisted of chronic asymptomatic HCV infected patients without advanced hepatic disease, peripheral hematologic alterations were observed, with a predominance of thrombocytopenia, in addition to a high frequency of bone marrow changes, with impairment of cell maturation. However, there was no association between the hematological changes with viral load, genotype and degree of fibrosis, but peripheral hematological alterations associated with degree of fibrosis were found. In view of the above, the identification and understanding of the establishment of hematological disorders associated with HCV, as well as its early diagnosis becomes relevant, since these

patients can benefit from an earlier approach of their disease and its specific treatment, even before they meet the liver criteria determined by the Ministry of Health, blocking the progression of these disorders before they become irreversible. Therefore, we suggest regular hematologic monitoring in patients infected with HCV and asymptomatic of liver disease.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- 1 Dieterich DT, Spivak JL: Hematologic Disorders Associated with Hepatitis C Virus Infection and Their Management. *Clin Infect Dis* 2003;37:533–541.
- 2 Klco JM, Geng B, Brunt EM, Hassan A, Nguyen T-D, Kreisel FH, et al.: Bone marrow biopsy in patients with hepatitis C virus infection: Spectrum of findings and diagnostic utility. *Am J Hematol* 2010;85:106–110.
- 3 Asfour, Ayoub MS, Magid NAA, Elsayharty AAI: Evaluation of bone marrow examination in patients with hepatitis C virus infection. *Egypt J Haematol* 2013;38:13.
- 4 Streiff M, Mehta S, Thomas DL: Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;35:947–952.
- 5 Anwar B, Hassan K, Asif N: Diagnostic Utility of Bone Marrow Examination in Chronic Liver Disease Patients Referred For Evaluation of Hematological Derangements. *Int J Pathol* 2012;10:13–16.
- 6 Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Crocè LS, Mazzoran L, et al.: Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut* 1999;44:874–880.
- 7 Moatter T, Hussainy AS, Hamid S, Ahmad Z, Siddiqui S: Comparative analysis of viral titers and histologic features of Pakistani patients infected with hepatitis C virus type 3. *Int J Infect Dis* 2002 [cited 2017 Aug 12];6:272–6.
- 8 Abou El Azm AR, El-Bate H, Abo-Ali L, Mansour N, Ghoraba H, Salem ML: Correlation of viral load with bone marrow and hematological changes in pale patients with chronic hepatitis C virus. *Arch Virol* 2012;157:1579–1586.
- 9 Mincis M, Mincis R: Esteatose e esteato-hepatite não alcoólicas; in : *Gastroenterologia & Hepatologia*, ed 4. São Paulo, Lemos Editorial, 2011, pp 873–882.
- 10 Lopes CLR, Teles SA, Espírito-Santo MP, Lampe E, Rodrigues FP, Motta-Castro ARC, et al.: Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. *Rev Saude Publica* 2009;43:43–50.
- 11 Duarte CAB: Detecção e quantificação do vírus da Hepatite C através de RT-PCR em tempo - real 2006 [cited 2017 Aug 13];Available from: <http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/6246>
- 12 Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al.: Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2005;38:41–9.
- 13 Silva LK, Silva MBS, Rodart IF, Lopes GB, Costa FQ, Melo ME, et al.: Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 2006;39:595–602.

- 14 Afdhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al.: Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* 2008;48:1000–1007.
- 15 Zhang W, Nardi MA, Borkowsky W, Li Z, Karparkin S: Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIb in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* 2009;113:4086–4093.
- 16 Pawlotsky J-M: Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004;12:96–102.
- 17 WEKSLER BB: Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:13–19.
- 18 Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D: Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3:3–14.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do comitê de ética em pesquisa



CENTRO DE ENSINO
SUPERIOR E
DESENVOLVIMENTO -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES PRECOSES HEMATOLÓGICAS PERIFÉRICAS E MEDULARES ASSOCIADAS AO VÍRUS DA HEPATITE C

Pesquisador: ROSIVANIA SILVA MOTA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51675715.3.0000.5175

Instituição Proponente: Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento-CESED/PB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.391.546

Apresentação do Projeto:

Estudos tem descrito alterações hematológicas periféricas e medulares associadas à hepatite C. Elas se desenvolvem tanto por agressão viral direta, quanto pela resposta imune crônica do organismo, expressando-se comumente como citopenias no sangue periférico e alterações diversas em medula óssea, tais como aplasia, displasia, siderose, hipo e hiper celularidades.

Assim, a compreensão sobre a instalação dos distúrbios hematológicos associados ao HCV, bem como do seu diagnóstico precoce torna-se relevante para o tratamento e/ou prevenção dos mesmos.

Esse estudo propõe verificar se existem diferenças hematológicas em medula óssea e sangue periférico dos pacientes recém-diagnosticados e assintomáticos infectados pelo HCV, considerando as cargas virais plasmáticas alta, intermediária e baixa e os genótipos 1a e 1b.

Trata-se de estudo observacional, transversal e analítico para verificar a frequência das alterações hematológicas medulares e periféricas, ao se considerar as diferentes cargas virais plasmáticas (alta, intermediária e baixa) e os genótipos 1a e 1b em pacientes recém-diagnosticados ao acaso, assintomáticos, infectados pelo HCV, no Estado da Paraíba.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: SENADOR ARGEMIRO DE FIGUEIREDO 1901

Bairro: ITARARE **CEP:** 58.411-020

UF: PB **Município:** CAMPINA GRANDE

Telefone: (83)2101-8857 **Fax:** (83)2101-8857 **E-mail:** cep@cesed.br