

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS ESTRELADAS E FIBROSE HEPÁTICA
EM CRIANÇAS COM HEPATITE AUTOIMUNE TIPO 1: ESTUDO IMUNO-
HISTOQUÍMICO PAREADO EM BIÓPSIAS HEPÁTICAS ANTES DO
TRATAMENTO E APÓS A REMISSÃO CLÍNICA**

JUSSARA MELO DE CERQUEIRA MAIA

**NATAL/RN
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS ESTRELADAS E FIBROSE HEPÁTICA
EM CRIANÇAS COM HEPATITE AUTOIMUNE TIPO 1: ESTUDO
IMUNOHISTOQUÍMICO PAREADO EM BIÓPSIAS HEPÁTICAS ANTES DO
TRATAMENTO E APÓS A REMISSÃO CLÍNICA**

JUSSARA MELO DE CERQUEIRA MAIA

Tese a ser apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Doutora Ana Maria de Oliveira Ramos.

**NATAL/RN
2009**

Serviços Técnicos

Catálogo da publicação na fonte: UFRN / Biblioteca Setorial do CCS

M1217a

Maia, Jussara Melo de Cerqueira

Ativação das células hepáticas estreladas e fibrose hepática em crianças com hepatite autoimune tipo 1: estudo imuno-histoquímico pareado em biópsias hepáticas antes do tratamento e após a remissão clínica. / Jussara Melo de Cerqueira Maia – Natal, RN, 2009. 59f.:Il.

Orientadora: Dra. Ana Maria de Oliveira Ramos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1.Hepatite autoimune - Tese. 2. Criança. 3. Fibrose. 4. Células hepáticas estreladas.
Tese. de Oliveira Ramos, Ana Maria.

RN/UF/BS-CCS

CDU.616.36-002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS ESTRELADAS E FIBROSE HEPÁTICA
EM CRIANÇAS COM HEPATITE AUTOIMUNE TIPO 1: ESTUDO
IMUNOHISTOQUÍMICO PAREADO EM BIÓPSIAS HEPÁTICAS ANTES DO
TRATAMENTO E APÓS A REMISSÃO CLÍNICA**

JUSSARA MELO DE CERQUEIRA MAIA

Tese a ser apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª Doutora Ana Maria de Oliveira Ramos.

**NATAL/RN
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROF^a. Dra. TÉCIA MARIA DE OLIVEIRA MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE DA BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ana Maria de Oliveira Ramos (UFRN)

Membros titulares

Prof^a. Dra. Ana Maria de Oliveira Ramos (UFRN)

Prof^a. Dra. Gilda Porta (USP)

Prof^a. Dra. Maria Eugênia Motta (UFPE)

Prof. Dr. Carlos André Nunes Jatobá (UFRN)

Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcante Júnior (UFRN)

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

Dedicatória

Aos meus pais, exemplo de sabedoria e integridade, por estimular em nós, filhos, o gosto pelo saber e cultivar em nossa família, valores fundamentais como fé, amor, paz e união.

Aos meus queridos filhos Rafael, Raquel e Raíssa, cujo amor, alegria e espontaneidade tornam nossos dias mais felizes.

Ao meu esposo Olavo, generoso, verdadeiro e justo, por compartilhar todos os momentos e participar integralmente da educação dos nossos filhos.

Agradecimentos

À Prof^a Doutora Ana Maria de Oliveira Ramos, orientadora e amiga, que desde os bancos da faculdade me encantou pela competência e amor dedicados à Patologia, tendo proporcionado apoio fundamental, com ética e profissionalismo, em todas as etapas da pesquisa.

Ao colega e amigo Prof. Doutor Hélcio de Sousa Maranhão, Chefe do Departamento de Pediatria da UFRN, companheiro desde os bons tempos de Colégio Marista de Natal e juntos como professores desde meados dos anos 90, pela ajuda inestimável na co-orientação do trabalho.

Aos pacientes, por compreenderem a importância do desprendimento na geração de conhecimentos que possam contribuir para o acompanhamento e controle da enfermidade.

Ao Departamento de Patologia da UFRN, por disponibilizar amostras de biópsias hepáticas dos pacientes estudados e aos seus funcionários, pela extrema paciência e zelo no manuseio desse material.

Ao Prof. Dr. Carlos César Formiga Ramos (*in memoriam*) do Laboratório Médico de Patologia Getúlio de Oliveira Sales e ao Biólogo e Professor Luís Reginaldo Menezes da Rocha, responsáveis, respectivamente, pelo financiamento e realização dos exames de imuno-histoquímica, sem os quais o trabalho não teria sido possível.

Ao Departamento de Cirurgia Experimental da UFRN na pessoa do Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros e do Professor Ítalo Medeiros, que tornaram possíveis a realização da histomorfometria e da análise estatística.

À Prof. Dra Jozana de Moura Caetano, Diretora Geral do Hospital de Pediatria da

UFRN, exemplo de competência, perseverança e luta em prol de nossa instituição, pela compreensão das justificadas ausências.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, responsável por minha formação acadêmica e da qual tenho a honra de participar como docente, pelo incentivo e por proporcionar a oportunidade desta qualificação, no ano em que comemora seus 51 anos de existência.

Sumário

Dedicatória.....	viii
Agradecimentos.....	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Introdução.....	01
Revisão da Literatura.....	03
Anexação de Artigo	09
Comentários, Considerações e Conclusões	16
Referências.....	25
Anexo 1.....	33
Anexo 2.....	35
Apêndice 1.1.....	36
Apêndice 1.2.....	37
Apêndice 1.3.....	38
Apêndice 2.....	40
Apêndice 3.....	43
Apêndice 4.....	44
Abstract.....	47

Lista de tabelas e figuras

- Tabela 1. Achados histológicos de atividade inflamatória hepática (0-4), fibrose (0-4) e achados imuno-histoquímicos de ativação das células hepáticas estreladas (CHE) em biópsias hepáticas pareadas antes do tratamento e após a remissão clínica e laboratorial de 8 crianças portadoras de Hepatite Autoimune tipo 1.....Apêndice 1
- Tabela 2. Achados laboratoriais e sorológicos ao diagnóstico de 8 crianças portadoras de Hepatite Autoimune tipo 1.....Apêndice 3
- Figura 1. Imuno-histoquímica da expressão da α -actina de músculo liso em biópsias hepáticas, antes do tratamento e após remissão clínica (IHQ X400).....Apêndice 1
- Figura 2. Imuno-histoquímica da expressão da α -actina de músculo liso nas biópsias hepáticas, antes do tratamento e após a remissão clínica (IHQ X400).....Apêndice 1
- Figura 3. Achados fenotípicos da ativação das CHE durante as fases de injúria e resolução da lesão hepática Apêndice 1.4

Lista de abreviaturas

α - AML	α -actina de músculo liso
AML	anti-músculo liso
ANA	anticorpo antinuclear
CHE	células hepáticas estreladas
HAI	hepatite autoimune
LKM-1	anti-microsomal fígado-rim tipo 1
TGF-Beta1	fator transformador de crescimento - beta 1
AST	aspartato aminotransferase
ALT	alanina aminotransferase
GGT	gamaglutamiltranspeptidase
IHQ	imuno-histoquímica
H&E	hematoxilina e eosina
PAS	ácido periódico de Shiff

Resumo

A ativação das células hepáticas estreladas (CHE) é considerada o evento mais importante na fibrogênese hepática. Na hepatite autoimune (HAI) este mecanismo é desconhecido e maiores evidências são necessárias quanto à evolução da fibrose. O objetivo desse estudo foi avaliar a ativação das CHE e a evolução da fibrose hepática em crianças portadoras de HAI tipo 1. Foram analisadas 16 biópsias hepáticas pareadas de oito pacientes, antes do tratamento e após a remissão clínica através de estudo imuno-histoquímico com anticorpo anti- α -actina de músculo liso e realizada a gradação da fibrose e da inflamação empregando-se o sistema de escores de Batts e Ludwig (0-4). Não houve significativa redução nos escores de fibrose após intervalo de tempo de 24 ± 18 meses entre as biópsias ($2,5 \pm 0,93$ vs. $2,0 \pm 0,53$, $P = 0,2012$). Observou-se redução significativa na inflamação: portal ($2,6 \pm 0,74$ vs. $1,3 \pm 0,89$, $P = 0,0277$), periportal/perisseptal ($3,0 \pm 0,76$ vs. $1,4 \pm 1,06$, $P = 0,0277$) e lobular ($2,8 \pm 1,04$ vs. $0,9 \pm 0,99$, $P = 0,0179$). A α -actina de músculo liso nas CHE foi expressa em biópsias hepáticas iniciais ($3491,93 \pm 2051,48 \mu\text{m}^2$) e mostrou significativa redução após a remissão clínica ($377,91 \pm 439,47 \mu\text{m}^2$) ($P = 0,0117$). A ativação de CHE foi demonstrada em crianças portadoras de HAI tipo 1. A redução de sua ativação após remissão clínica, a qual pode preceder a redução da fibrose, abre importantes perspectivas no *follow-up* da HAI.

Palavras chave: hepatite autoimune; criança; fibrose; células hepáticas estreladas.

1. INTRODUÇÃO

As CHE (lipócitos, células Ito, células de reserva de vitamina A) estão presentes no espaço entre as células do parênquima e as do endotélio dos sinusóides dos lóbulos hepáticos, sendo responsáveis pelo estoque de 80% do retinol de todo o organismo, na forma de palmitato de retinol, presente em vesículas (*droplets*) de lipídeos citoplasmáticas (1). As células estreladas também existem em órgãos extra-hepáticos como pâncreas, pulmão, coração, rim e intestino. Portanto, as células estreladas hepáticas e extra-hepáticas formam o que se denomina *sistema de células estreladas* (1, 2). Em condições fisiológicas, essas células desempenham papel primordial na regulação da homeostase do retinol. Em situações patológicas, como na fibrose hepática, as CHE sofrem processo conhecido como “ativação”, perdem o retinol e sintetizam grande quantidade de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas de adesão (1).

A fibrose hepática é um processo dinâmico que envolve deposição e degradação de colágeno fibrilar e outras proteínas da matriz extra-celular (3).

A regressão da fibrose pode ser observada em várias doenças hepáticas crônicas, eliminando-se o agente etiológico ou a base patogênica da lesão hepática (4) ou espontaneamente (5). Há relato de regressão da fibrose hepática após tratamento antiviral em pacientes portadores de hepatite B e C (6, 7), terapia com penicilamina na doença de Wilson (8), metotrexato e ácido ursodeoxicólico no tratamento da cirrose biliar primária (9) e corticosteróides em pacientes portadores de hepatite autoimune (10).

Duas formas de hepatite autoimune (HAI) têm sido descritas em crianças: tipo-1, associada à presença de anticorpo antinuclear (ANA) e/ou anti-músculo liso

(AML), e tipo-2, associada ao anticorpo anti-microsomal fígado-rim tipo1 (LKM-1). Apesar de essas duas formas terem diferentes achados clínicos, bioquímicos e histológicos, são descritas de modo semelhante quanto à gravidade e evolução (11).

A longo prazo, a evolução é favorável para a maioria dos pacientes com HAI tratados, mas alguns deles, apesar do tratamento imunossupressor e da remissão clínica e bioquímica, progridem para cirrose (11, 12, 13). Por outro lado, há relato de reversão da fibrose em pacientes adultos portadores de HAI tratados com corticosteróides, com intervalo médio de biópsias de controle variando de 4 a 14 anos (10, 14, 15). A reversão da cirrose é provavelmente um processo lento, mas em alguns subgrupos pediátricos, o curto tempo de doença hepática e a forte atividade regenerativa poderiam assim acelerá-la (16). Na HAI, a ativação das CHE é desconhecida, assim como a fibrose hepática necessita de maiores evidências quanto a sua evolução. Neste sentido, realizou-se estudo imuno-histoquímico em amostras pareadas de biópsias hepáticas de crianças portadoras de HAI tipo-1, obtidas antes do tratamento e depois da remissão clínica, respectivamente, com o objetivo de avaliar tais aspectos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Hepatite Autoimune

A HAI é uma doença inflamatória do fígado, caracterizada histologicamente por hepatite de interface, sorologicamente por autoanticorpos não-órgão específicos e níveis elevados de imunoglobulina G (17, 18, 19). Predomina no sexo feminino, associa-se com hipergamaglobulinemia e outras condições autoimunes (20, 21, 22). A natureza dos autoanticorpos detectados no soro ao diagnóstico leva ao reconhecimento de dois tipos de HAI: tipo-1, associado à presença do anticorpo anti-músculo liso (AML) e/ou antinuclear (ANA) e tipo-2, ao anticorpo anti-microsomal fígado-rim tipo-1 (23). Os dois tipos de HAI podem também ser distinguidos por *background* genéticos dos pacientes e achados clínicos. A escolha do tratamento e o prognóstico parecem não ser influenciados pelo tipo de HAI, mas o tipo-2 apresenta-se mais frequentemente com cirrose em idade precoce (23, 24). A HAI é primariamente uma doença pediátrica: 40% dos casos são diagnosticados antes dos 18 anos de idade, com média de 10 anos, e 80% dos casos do tipo-2, antes dos 18 anos de idade, com média de início aos 6,5 anos (23, 24).

A predominância no sexo feminino é achado constante, tanto na criança quanto no adulto, com relação de 3 a 4:1 na HAI tipo-1 e 8 a 9:1 na tipo-2. O modo mais frequente de apresentação na população pediátrica é de uma síndrome de hepatite aguda, raramente com falência hepática fulminante ou subfulminante (17, 23, 24, 25).

Achados clínicos e laboratoriais têm levado à hipótese de que a HAI é doença multifatorial. Fatores genéticos e ambientais, incluindo infecções virais e drogas, desempenham papel importante na sua patogênese (26, 27, 28). Os agentes desencadeantes podem ser vários, dependendo da etnia, da população, da origem

geográfica, levando ao reconhecimento cruzado e desencadeando a autoimunidade a partir de epítomos diferentes. Se houver falha no mecanismo da imunorregulação, associada à presença de fatores genéticos predisponentes como do complexo HLA, as células T reconheceriam os componentes celulares e, por sua vez, auxiliariam as células B a identificarem o mesmo antígeno, levando à produção de autoanticorpos (26, 29). No Brasil, ao diagnóstico, os achados clínicos da HAI tipo-1 diferem de pacientes caucasóides dos Estados Unidos, por terem início de doença mais precoce, baixa frequência de doença autoimune concomitante, níveis mais elevados de aspartato aminotransferase e γ -globulina, maior ocorrência de anticorpos anti-músculo liso e menor frequência de anticorpos antinuclear. Em nosso país, o HLA DR13 e DRB1*1301 são mais frequentes do que o HLA DR4 (30).

Dentre os achados histopatológicos, a lesão mais característica é a presença de infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, além de plasmócitos, no trato portal, invadindo o lóbulo e produzindo hepatite de interface. Necrose em ponte e formação de rosetas são também achados comuns (23, 24). A presença de cirrose à época do diagnóstico foi relatada em séries pediátricas em 59 a 100% dos casos (20, 23, 24).

Em 1993, o Grupo Internacional de Hepatite Autoimune publicou o sistema de escores para o diagnóstico de HAI até o momento mais utilizado, tendo sido revisado em 1999 (31) (Anexo1). Recentemente (2009) foi proposto sistema de escores simplificado (32).

O tratamento da HAI consiste na administração de drogas imunossupressoras para o controle do processo inflamatório, podendo ser feito com prednisona isolada ou associada à azatioprina, e tem como meta a remissão clínica, manutenção das aminotransferases normais ou com no máximo de duas vezes o maior valor de

referência e a redução do infiltrado inflamatório hepático. (31, 33, 34, 35). A resposta alcançada em mais de dois terços dos pacientes caracteriza-se pela melhora dos sintomas e redução das aminotransferases. A melhora histológica é mais tardia. Alguns pacientes não respondem ao tratamento, e podem necessitar de transplante hepático (34). Quando há normalização dos níveis séricos de aminotransferases, em geral após 1 ano de tratamento, azatioprina pode ser usada como monoterapia para manutenção da remissão (36). O uso da ciclosporina, na doença grave e não responsiva ao esquema habitual tem sido recomendado, bem como as opções do micofenolato mofetil e budesonide nos casos moderados (26, 37, 38, 39). No Brasil, Porta observou taxa de sobrevida de mais de 90%, após 10 anos do diagnóstico, de pacientes portadores de HAI tratados (40). Nos casos de falha terapêutica e evolução para insuficiência hepática, deve-se considerar o transplante hepático, devendo-se observar a possibilidade de recorrência da HAI em 10 a 35% dos casos transplantados (41, 42).

Células hepáticas estreladas

As CHE são as células fibrogênicas-chave. Em consequência de lesão de lesão hepática de várias etiologias, essas células tornam-se “ativadas”, que corresponde à transição de células quiescentes, ricas em vitamina A, em miofibroblastos contráteis (43, 44).

A ativação das CHE é um evento chave na lesão hepática e tem um papel central na produção e na degradação da matriz extracelular (3, 45). Nos últimos anos, modelos experimentais em ratos (46) e estudos em cultura de células com ênfase nas CHE trouxeram grande contribuição aos conhecimentos acerca da fibrogênese hepática, da regressão da fibrose e reversão da cirrose. Os estímulos

que levam à ativação das CHE incluem a necrose hepatocelular devido ao estresse oxidativo, apoptose e os fatores de crescimento solúveis, especialmente o fator transformador de crescimento - beta 1 (TGF-Beta1) e intermediários das reações de oxigênio/peróxidos lipídicos (45) (Figura 3).

Mecanismos fibrogênicos específicos de algumas doenças têm sido descritos: na hepatite C, incluem o estímulo direto das CHE pela infecção viral (47, 48), interleucina 15 em pacientes coinfetados com hepatite C e HIV (49), na hemocromatose, concentração hepática elevada de ferro (50) e na esteatohepatite não alcoólica, níveis elevados de leptina sinalizam aumento da fibrogênese hepática pelas CHE (51, 52, 53). A fisiopatologia da HAI é complexa e envolve predisposição genética, exposição prévia a antígenos, fatores desencadeadores e desregulação do sistema imune (54). Apesar dos avanços acerca dos conhecimentos da fisiopatologia da HAI, novos modelos são necessários para se entender os mecanismos pelos quais as CHE podem estar envolvidas nesse processo.

O destino das CHE durante a resolução da lesão hepática é incerto, mas pode incluir a reversão para o fenótipo quiescente e/ou o seu desaparecimento (*clearance*) através da apoptose (55, 56, 57, 58) (Figura 3). Apesar dos novos avanços, incluindo o papel dos micro-RNAs (59), as vias intercelulares que regulam a sobrevivência e morte dessas células são ainda pouco compreendidas.

Regressão da fibrose pode ocorrer em várias doenças hepáticas crônicas, eliminando-se o agente patogênico ou a base patogênica da lesão hepática (4) ou espontaneamente (5). Esse processo tem sido observado após tratamento antiviral para hepatite B e C (6, 7), tratamento com penicilamina para doença de Wilson (8), metotrexate e ácido ursodeoxicólico para o tratamento de cirrose biliar primária (9) e corticosteróides na HAI (10).

A evolução da fibrose hepática na HAI não foi ainda suficientemente investigada nas séries pediátricas. Não somente a fibrose é reversível como parece bastante claro que a cirrose também o é. O exato estágio no qual a fibrose e/ou cirrose tornam-se irreversíveis não é conhecido (4), mas parece que a reversão somente ocorra nos estágios clínicos iniciais da doença, tornando-se improvável em pacientes com doença hepática avançada (Child-Pugh classe C com hipertensão portal) (60).

Em adultos portadores de HAI tratados com corticosteróides, regressão da fibrose e reversão da cirrose têm sido relatadas (10, 14, 15). Nos pacientes em que tais eventos foram evidenciados, o intervalo médio de tempo entre as biópsias foi de 4 a 14 anos, demonstrando que se trata de um processo lento. Em crianças e adolescentes, há poucos pacientes documentados. Dufour *et al* (60) observaram reversão da cirrose após o tratamento de 8 pacientes portadores de HAI (incluindo uma criança). Após intervalo médio de biópsias de 63 meses, houve redução significativa tanto da inflamação quanto da fibrose. Bortolotti *et al* (16) sugerem que o processo de reversão da cirrose em alguns grupos de crianças possa acontecer em menor tempo devido à maior capacidade regenerativa do fígado.

Redução significativa da atividade necroinflamatória nas biópsias hepáticas pós-remissão foi também observada em crianças portadoras de HAI tratadas com corticosteróides e imunossupressores (12), com intervalo médio de biópsias de 2 anos.

O papel dos corticosteróides na redução da inflamação e sua consequente ação antifibrótica tem sido investigado. Estudos prévios demonstraram que a supressão da atividade inflamatória promove o desaparecimento de inibidores de metaloproteinase, degradação da matriz fibrótica do fígado e apoptose da CHE (61,

62). Dessa forma, os corticosteróides, que representam a base terapêutica para o tratamento efetivo da HAI, poderiam mudar a tendência progressiva da fibrose para a degradação da matriz e remodelação (14). Por outro lado, a despeito do tratamento imunossupressor e da remissão clínico-laboratorial, alguns pacientes com HAI evoluem para cirrose (11,12). Os determinantes da progressão da fibrose incluem fatores ambientais e genéticos; há esforços atuais para se definir polimorfismos específicos e a possível correlação desses com as taxas de progressão da fibrose (63, 64, 65).

3. ANEXAÇÃO DE ARTIGO

Editorial Manager (tm) for European Journal of Gastroenterology & Hepatology

Manuscript Draft

Manuscript Number: EJGH2685R1

Title: Hepatic Stellate Cell Activation and Hepatic Fibrosis in Children with Type 1
Autoimmune

Hepatitis: an Immunohistochemical Study of Paired Liver Biopsies Before Treatment
and After Clinical Remission.

Article Type: Original Study

Keywords: keywords: hepatic stellate cells; fibrosis; autoimmune hepatitis; children.

Impact Factor: 2.08



Hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis in children with type 1 autoimmune hepatitis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies before treatment and after clinical remission

Jussara Melo de Cerqueira Maia^{a,b}, Helcio de Sousa Maranhão^{a,b},
Lauro Virgilio de Sena^b, Luiz Reginaldo Menezes da Rocha^c,
Italo Azevedo de Medeiros^d and Ana Maria de Oliveira Ramos^{a,c}

1001

Objectives The activation of hepatic stellate cells (HSC) is considered the most important event in hepatic fibrogenesis. The precise mechanism of this process is unknown in autoimmune hepatitis (AIH), and more evidence is needed on the evolution of fibrosis. The aim of this study was to assess these aspects in children with type 1 AIH.

Methods We analyzed 16 liver biopsy samples from eight patients, paired before treatment and after clinical remission, performed an immunohistochemical study with anti- α actin smooth muscle antibody and graded fibrosis and inflammation on a scale of 0–4 (Batts and Ludwig scoring system).

Results There was no significant reduction in fibrosis scores after 24 \pm 18 months (2.5 \pm 0.93 vs. 2.0 \pm 0.53, $P=0.2012$). There was an important decrease in inflammation: portal (2.5 \pm 0.74 vs. 1.3 \pm 0.89, $P=0.0277$), periportal/periseptal (3.0 \pm 0.76 vs. 1.4 \pm 1.06, $P=0.0277$), and lobular (2.8 \pm 1.04 vs. 0.9 \pm 0.99, $P=0.0179$). Anti-

actin smooth muscle antibodies were expressed in the HSC of the initial biopsies (3491.93 \pm 2051.48 μm^2), showing a significant reduction after remission (377.91 \pm 439.47 μm^2) ($P=0.0117$).

Conclusion HSC activation was demonstrated in the AIH of children. The reduction of this activation after clinical remission, which may precede a decrease in fibrosis, opens important perspectives in the follow-up of AIH. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 00:000–000 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2009, 00:000–000

Keywords: autoimmune hepatitis, children, fibrosis, hepatic stellate cells

^aPostgraduate Program in Health Sciences, Department of Pediatrics, ^bPathology and ^cSurgery, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Correspondence to: Dr Ana Maria de Oliveira Ramos, MD, PhD, Federal University of Rio Grande do Norte, Rua Alameda das Margaridas, 1250, Apró 400, Tinel, Natal CEP 59020-980, Brazil

Tel: +55 04 3611 1297, fax: +55 04 3010 1046, e-mail: amramos@liver.com.br

Received 14 September 2008 Accepted 17 December 2008

Introduction

Hepatic stellate cells (HSC) play a pivotal role in hepatic fibrogenesis. After liver injury of any etiology, HSC undergo a response known as 'activation'. This is the transition of quiescent vitamin A-rich cells into proliferative, fibrogenic, and contractile myofibroblasts [1]. Hepatic fibrosis is a dynamic process involving deposition and degradation of fibrillar collagens and other extracellular matrix proteins [2].

Fibrosis regression can be achieved in various chronic liver diseases by eliminating the etiologic agent or pathogenic basis for the liver injury [3] or spontaneously [4]. Hepatic fibrosis has been seen to regress after antiviral treatment of chronic hepatitis B and C [5,6], penicillamine therapy for Wilson's disease [7], methotrexate and ursodeoxycholic acid for the treatment of primary biliary cirrhosis [8], and in corticosteroid-treated autoimmune hepatitis (AIH) [9].

Two main forms of AIH have been described in children: type I, associated with antinuclear antibodies (ANA) and/

or anti-smooth muscle antibodies (SMA); and type II, associated with liver/kidney microsomal type 1 antibodies. Although these two types of AIH have different clinical, biochemical, and histological features, they are reported to be similar in severity and outcome [10].

The long-term outcome is favorable for most patients with treated AIH but some, notwithstanding immunosuppressive therapy, together with clinical and biochemical remission, develop into cirrhosis [10–12]. In contrast, there are reports of cirrhosis reversal and fibrosis regression in corticosteroid-treated AIH adult patients with a follow-up biopsy interval ranging from 4 to 14 years [9,13,14]. Possible explanations for this finding include fibrosis resolution or inaccurate staging of the original biopsy [15]. Cirrhosis reversal is probably a slow process, but in some pediatric subgroups short-lived liver disease and stronger regenerative activity could accelerate it [16].

In AIH, the activation of HSC is unknown, and more research is needed on the evolution of hepatic fibrosis. Thus, to evaluate these aspects, we performed an

immunohistochemical study in liver biopsy samples of children with type 1 AIH, before treatment and after clinical remission.

Patients and methods

From March 1997 to September 2006, 18 patients who met established criteria for AIH diagnosis, based on the scoring system of the International Autoimmune Hepatitis Group [17], were enrolled in the Gastroenterology and Hepatology Facility at the Federal University of Rio Grande do Norte Pediatric Hospital, Natal, Brazil. Scores for a definitive diagnosis [17] were obtained for all patients. Hepatitis B and C and other possible causes of hepatitis were excluded by appropriate investigations. Data were collected by reviewing medical records and a research protocol was applied retrospectively until 2003 and prospectively after that. The study protocol was approved by the Medical Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Norte.

Ten patients from this group were excluded from outcome analysis: a 7-year-old boy with overlap syndrome (ANASMA positive, sclerosing cholangitis and AIH), a 9-year-old boy ANASMA positive with cirrhosis at presentation who died 3 months after diagnosis, a 12-year-old girl with type 1 AIH who discontinued follow-up 6 months after the start of clinical treatment, an 11-year-old girl with postinfectious giant cells hepatitis, 7 and 10-year-old boys with type 2 AIH, a 7-year-old girl with type 1 AIH and only 3 months of clinical follow-up and three girls, aged 3, 10, and 12 years with type 1 AIH whose hepatic samples were found to be inappropriate for immunohistochemical (IHC) study. All eight patients selected were type 1 AIH and had a follow-up with at least two liver biopsies.

The following data were analyzed: sex, age at diagnosis, clinical form at presentation, treatment used, mean time to clinical and biochemical remission, duration of follow-up, and sera levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase, γ -glutamyltransferase (GGT), γ -globulin and total bilirubin, and direct bilirubin at presentation. SMA and ANA were measured in all patients using previously published techniques and liver/kidney microsomal type 1 antibodies by indirect immunofluorescence [18]. Seropositivity required a titer of at least 1:40, 1:40, and 1:10, respectively.

Each of the eight selected patients underwent at least two percutaneous needle liver biopsies: the first performed during evaluation (initial liver biopsy) and the second at least 1 year after clinical and biochemical remission [19,20]. The preestablished criteria for remission were the following: absence of symptoms and improvement of serum AST levels to less than twice the upper limit of normal [21].

The mean length of the liver biopsy core samples was 1.3 ± 0.03 cm and the mean number of portal tracts per

specimen was 8.51 ± 1.66 . At diagnosis, patients were treated with prednisone dosed at 2 mg/kg/day (maximum of 60 mg daily) and azathioprine at 1–2 mg/kg/day (maximum dose of 75 mg) [22] followed by a gradual tapering according to clinical symptoms and aminotransferase activity. At the time of postremission liver biopsy, all patients were undergoing clinical treatment and were in clinical remission.

All biopsies were reviewed blindly by a single hepatopathologist. The staging of fibrosis and the grade of inflammation were recorded on a 0–4 scale using the Batts and Ludwig scoring system [23].

The Batts and Ludwig scoring system used for the histological grading of disease activity in chronic hepatitis was based on the following criteria: portal inflammation only/no lymphocytic piecemeal necrosis/no lobular inflammation and necrosis (grade 0); minimal and patchy portal inflammation/minimal or occasional spotty necrosis (grade 1); mild portal inflammation involving some or all the portal tract/mild lobular inflammation and little hepatocellular damage (grade 2); moderate portal inflammation involving all portal tract/moderate lobular inflammation with noticeable hepatocellular change (grade 3); and severe portal inflammation/severe lobular inflammation and necrosis, with prominent diffuse hepatocellular damage (grade 4) [23].

To determine the histological stage (fibrosis) of chronic hepatitis, the Batts and Ludwig scoring system uses the following criteria: grade 0 (no fibrosis); grade 1 (fibrosis portal expansion); grade 2 (periportal or rare portal-portal septa); grade 3 (fibrous septa with architectural distortion, no obvious cirrhosis), and grade 4 (cirrhosis) [23].

Unlike viral hepatitis, for which there are scores such as those proposed by Knodell *et al.* [24], Ishak *et al.* [25], and METAVIR [26], there is no specific system for AIH. Hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, reticulin (Gomori), Van Gieson (collagen), PAS with and without diastase and Perl's stains for iron overload were available in all cases.

To analyze activated IHC, we performed an IHC study using anti- α -SMA (α -smooth muscle actin; Sigma Chemical Co., Poole, UK) specific monoclonal antibody. The positivity for anti- α -SMA was quantified using a digitalized system and an image analyzer. The total microscopic field area in the histological sections stained by the IHC technique was observed using an Olympus BX-45 trinocular optical microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan). The images were captured with a 400 \times Samsung digital camera (Samsung Electronics America, Inc., NJ, EUA) and processed using Image-Pro-plus software, version 3.0 (Media Cybernetics LP, Maryland, USA). The digitalized field was divided by the software into image units called picture elements or pixels, with definite coordinates. After the desired

resolution ($\times 200$) was selected, the optical impulses were digitalized, resulting in an image from each field stored and processed in the multimedia system. Four digitalized images of the histological sections of each biopsy were obtained and examined to quantify the activated HSC, whose intensity was determined by the arithmetic mean of the number of pixels (HSC positives for α -SMA) for the four separate fields, each composed of 303×360 pixels (μm^2).

All histological findings were analyzed and compared for each patient before treatment and after clinical and biochemical remission.

Statistical analysis was performed using Fisher's exact test for categorical variables and Wilcoxon's test for continuous variables. Results are expressed as mean value \pm SD. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

The mean age at presentation was 8.1 ± 3 years and all except one of the patients were girls (87.5%). Three clinical disease patterns were observed: (i) in five patients (five of eight) the presentation was indistinguishable from that of acute viral hepatitis; (ii) two patients (two of eight) had insidious onset with an illness characterized by progressive fatigue, relapsing jaundice, anorexia, headache, and weight loss; and (iii) in one (one of eight) patient, hepatomegaly and abnormal liver function were observed during consultation for recurrent abdominal pain.

At presentation, the mean level of serum total bilirubin was 10.79 ± 8.14 mg/dl and of direct bilirubin 8.85 ± 6.8 mg/dl. In seven of eight patients (87.5%), alanine aminotransferase and AST exceeded the upper limit of normal by five-fold, with a mean value of 896 ± 429 and 1120 ± 566 U/l, respectively.

Gamma-globulin sera levels were high in all patients, with a mean value of 2.67 ± 0.68 g/dl. GGT values were also elevated in all patients (108.2 ± 86.4 IU/l) and in a 12-year-old girl, who showed persistently high levels of GGT; retrograde endoscopic cholangiopancreatography was normal, and after the corticosteroid dose was increased, the levels normalized. ANA and SMA were positive in six of eight and four of eight patients, respectively, and in two of eight patients, for both. Immunoglobulin G -anti viral hepatitis A (VHA) was also found in five of eight patients, one also being immunoglobulin M positive on admission.

All patients responded to corticosteroid and immunosuppressive remission induction therapy. The mean number of months to biochemical remission was 8.4 ± 5.4 . After a mean clinical follow-up of 61 ± 27 months, all patients have been found to be in good health, with one patient currently on azathioprine monotherapy without any disease exacerbation [27].

Table 1. Histological features of inflammatory hepatic activity (score 0–4) and fibrosis (score 0–4) and immunohistochemical features of activated hepatic stellate cells (μm^2) in paired liver biopsies before treatment and after clinical remission of eight children with type 1 autoimmune hepatitis

Histologic feature	Before	After	<i>P</i> value*
PI	2.6 ± 0.74	1.3 ± 0.89	0.0277
PP	3.0 ± 0.76	1.4 ± 1.08	0.0277
LI	2.8 ± 1.04	0.9 ± 0.99	0.0170
Fibrosis	2.5 ± 0.93	2.0 ± 0.53	0.2012
HSC activated	3491.93 ± 2051.48	377.91 ± 459.47	0.0117

HSC, hepatic stellate cells; LI, lobular inflammation; PI, portal inflammation; PP, periportal/periseptal inflammation.

*Significance level $P < 0.05$, Wilcoxon's test.

The degree of fibrosis (stage) did not decrease significantly during the 24 ± 18 month period after the mean interval between liver biopsies. The mean fibrosis score in the initial liver biopsies was 2.5 ± 0.93 and in the liver biopsies after clinical remission it was 2.0 ± 0.53 ($P = 0.2012$).

In contrast, a significant decrease in inflammation was observed in postremission liver biopsies compared with the initial biopsies. The mean scores of initial and postremission liver biopsies were portal inflammation: 2.6 ± 0.74 and 1.3 ± 0.89 ($P = 0.0277$), periportal/periseptal inflammation: 3.00 ± 0.76 and 1.4 ± 1.06 ($P = 0.0277$), and lobular inflammation: 2.8 ± 1.04 and 0.9 ± 0.99 ($P = 0.0170$), respectively (Table 1).

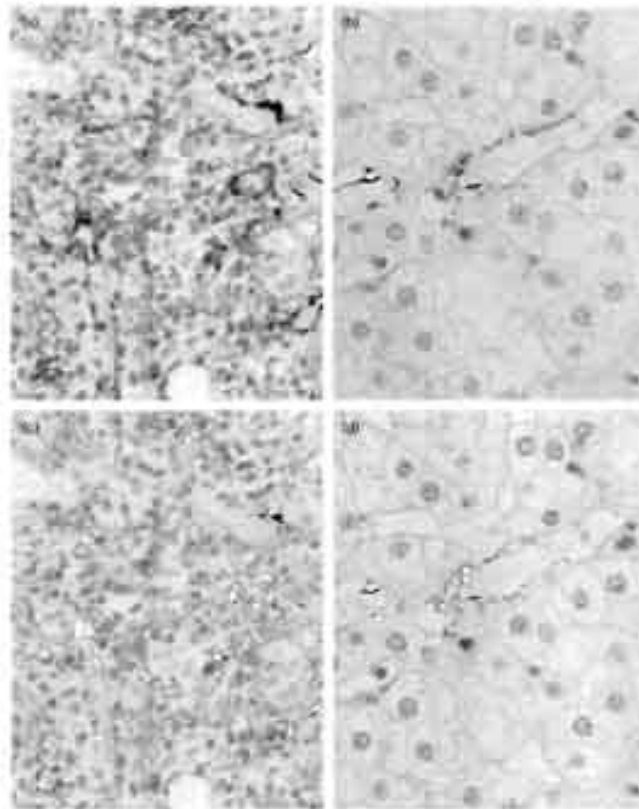
The HSC were activated, expressing anti- α -SMA in the initial liver biopsies ($3491.93 \pm 2051.48 \mu\text{m}^2$). In the postremission liver biopsies, however, a significant reduction was observed in HSC activation ($377.91 \pm 459.47 \mu\text{m}^2$) ($P = 0.0117$) (Table 1 and Fig 1a–d).

Discussion

Despite the increasing diagnostic accuracy of noninvasive methods for the quantitative assessment of liver fibrosis, these alternatives have been used mainly in patients with chronic hepatitis C and B [28–31] and in a few studies with children [32]. However, liver biopsy is still the recommended method for following the evolution of fibrosis in AIH [19,20]. The histological assessment of suitably sized liver tissue samples, performed by a single observer and HSC quantification using computerized histomorphometry provided more reliable results in this study.

The pathophysiology of AIH is complex and involves genetic predisposition, previous exposure to antigens (autoantigens), the presence of triggering factors, and deregulation of the immune system [33,34]. HSC activation is a key event in liver injury and plays a central role in the production and degradation of the extracellular matrix [35,36]. Stimuli driving stellate cell activation include hepatocellular necrosis because of oxidant stress,

Fig. 1



(a) and (b) Immunostaining of anti-smooth muscle antibodies (SMA) expression in initial liver biopsy before treatment (a) and after clinical remission (b) (SMA x 400). The same images shown in (c) and (d), corresponding to the immunostaining of smooth muscle (anti-SMA) actin expression captured in digitalized optical impulses, resulting in images from each field stored and processed in the multimedia system in the initial liver biopsy before treatment (c) and after clinical remission (d) (SMA x 400).

apoptosis and soluble growth factors, especially transforming growth factor- β 1, and reactive oxygen intermediates/lipid peroxides [35].

The epidemiological pattern of hepatitis A virus (HAV) infection has been changing in Latin America in the last few years [37]. In Brazil, the epidemiology of VHA infection is characterized by a heterogeneous pattern: low endemicity being observed in the South and Southeast regions with an anti-VHA prevalence rate of 55.7%, whereas observing the highest anti-VHA rates, 92.8 and 76.5%, in the North and Northeast regions, respectively [38,39].

Susceptibility to AIH is imparted by genes within the major histocompatibility complex – the human leukocyte

antigen (HLA) region – on the short arm of chromosome 6, especially genes encoding HLA DRB1 alleles [33]. In Europe and North America, susceptibility to type I AIH is conferred by the presence of HLA DR3 (DRB1*0301) and DR4 (DRB1*0401) [40]. Type I AIH in Brazil has different features at presentation than the disease in Caucasian patients from the United States: the patients from Brazil have earlier disease onset, lower frequency of concurrent immune diseases, higher serum levels of AST and γ -globulin, greater occurrence of smooth muscle antibodies, and lower frequency of antinuclear antibodies than the patients from the United States. HLA DR13 and DRB1*1301 occur more commonly in the Brazilian patients and HLA DR4 less often [41]. These data

stimulate the formation of the future profile of IHLA in our patients, in an attempt to correlate them to the manifestations and the distinct clinical evolutions of the European and North American patterns previously studied.

Disease-specific fibrogenic mechanisms with the activation of HSC have been described. In hepatitis C, this may include direct stimulation of HSC by viral infection [42,43]; increasing hepatic iron concentration in hemochromatosis [44] and in nonalcoholic steatohepatitis, elevated levels of leptin and increased leptin signaling by stellate cells increase fibrogenesis [45–47]. This pioneering IHQ study showed that these cells are activated in type 1 AIH in children, awakening the interest to explain the underlying mechanisms of this process.

In the postremission liver biopsies obtained after treatment, with a mean interval of 24.18 months between biopsies, a significant decrease in HSC activation was observed. The fate of activated HSC during the resolution of liver injury is uncertain, but may include reversal to a quiescent phenotype and/or selective clearance by apoptosis. The intercellular pathways that regulate the survival and death of these cells are still poorly understood [35,48–50].

Fibrosis regression and cirrhosis reversal in corticosteroid-treated AIH adult patients have been reported [9,13,14]. In these patients, the mean interval between biopsies was from 4 to 14 years, showing that when fibrosis regression and cirrhosis reversal occur, it is likely a slow process. Dufour *et al.* [51] observed cirrhosis reversal in eight patients with treated AIH, only one of whom was a child, and after a mean biopsy interval of 63 months, there was a significant reduction in both inflammation and fibrosis. There are few studies in children with type 1 AIH with respect to the histological evolution of fibrosis in postremission liver biopsy. Methodological and technical difficulties add important limitations to the studies. The aforementioned considerations make the findings of this sample relevant. The results showed fibrosis regression, although not significant, over a mean interval of 24.1 months between biopsies. This fact points to the need of a more prolonged histological follow-up so that proposals such as this can be confirmed. It has been suggested that the cirrhosis reversal process in some groups of children might occur in less time than adults, owing to greater tissue regeneration capacity [16].

Despite clinical treatment and laboratory remission, some patients with AIH evolve to cirrhosis [10–12]. In our group of patients, one of eight had worse fibrosis scores. Determinants of fibrosis progression include both environmental and genetic factors; there are ongoing efforts to define specific polymorphisms and correlate them with fibrosis progression rates [35,52,53].

A significant reduction in necroinflammatory activity in the postremission biopsies was observed in this study, and in others involving children with AIH treated with corticosteroids and immunosuppressors, with a mean liver biopsy interval of 2 years [11]. Earlier studies have shown that suppression of inflammatory activity promotes the disappearance of metalloproteinase inhibitors, degradation of the fibrotic liver matrix by unrestricted metalloproteinases, and HSC apoptosis [54,55].

In conclusion, HSC are activated in AIH and a decrease in the activation of these cells in postremission liver biopsies were demonstrated. The finding that SMA expression was reduced in patients who reached biochemical remission is surprising, given that it has never been previously shown. Future investigations must focus on the pathogenic mechanisms of HSC activation and the identification of host susceptibility factors that may provide alternative treatment strategies in AIH. The results showed a significant reduction in inflammation scores, in postremission liver biopsies performed with a mean interval of 24.14 months. Although less significant, there was a reduction in fibrosis scores, calling attention to the need for a more prolonged histological follow-up.

Acknowledgement

Conflicts of interest: none declared.

References

- 1 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; **275**:2247–2250.
- 2 Olson E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; **29**:830–841.
- 3 Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; **328**:1829–1835.
- 4 Borziani F, Guido M, Cadrovi P, Ortolini C, Barbesino S, Rogge M, *et al.* Spontaneous regression of hepatitis B virus associated liver cirrhosis developed in childhood. *Dig Liver Dis* 2004; **37**:994–997.
- 5 Neuman YO, Goodman ZD, Dienstag J, Schiff ER, Brown NA, Burdard C, *et al.* Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; **35**:949–955.
- 6 Poyard T, McFarlane J, Morris M, Trepo C, Lindley K, Goodman Z, *et al.* Impact of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; **123**:1300–1313.
- 7 Fallaer S, Samuelsen O, Spoin S. Phenolamine-induced normalization of clinical signs, and liver morphology and histology in a case of Wilson's disease. *Pediatrics* 1970; **45**:200–203.
- 8 Koptan MM, DeLillo RA, Walls HJ. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Ann Intern Med* 1997; **126**:582–588.
- 9 Scherz R, Glazerson H, Willard D. Survival and histological resolution of fibrosis in patients with autoimmune chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993; **18**:15–23.
- 10 Gregorio GV, Purmann B, Reid F, Donadon PT, Doherty DG, McCartney M, *et al.* Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997; **25**:541–547.
- 11 Saadiah O, Smith AL, Hendler W. Outcome of autoimmune hepatitis in children. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; **16**:1297–1302.
- 12 Casaj A, Caparite HA. Progressive fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2004; **39**:1631–1638.
- 13 Cotler SJ, Jakilo S, Jensen DM. Resolution of cirrhosis in autoimmune hepatitis with corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol* 2001; **32**:405–420.
- 14 Casaj A, Caparite HA. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J Hepatology* 2004; **40**:646–652.

19. Coja AJ, Carpenter HA. Sensitivity, specificity and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105:1824-1832.

20. Boticelli F, Gracia M. Reversal of Liver Carcinoma: A desirable clinical outcome and its pathogenic background. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 46:401-408.

21. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bombardieri JK, Campado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:929-326.

22. Coja AJ, Mann MP, Homburg HA. Frequency and significance of antibodies to non-fusible nucleocapsid type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 103:1290-1298.

23. Sully P. *Chronic Hepatitis*. In: Balow WF, Steke JT, editors. *Pediatric Hepatology*. New York: Massachus Publishing Corporation, 1987. pp. 370-384.

24. Carpenter HA, Coja AJ. The role of histologic evaluation in the diagnosis and management of autoimmune hepatitis and its variants. *Clin Liver Dis* 2002; 6:695-705.

25. Coja AJ, Mason KW, Carpenter HA. Sustained remission after corticosteroid therapy for type 1 autoimmune hepatitis: A retrospective analysis. *Hepatology* 2002; 36:890-897.

26. Muggioni G, Bernard O, Hochhaus M, Hochhaus F, Oellers M, Alajz D. Treatment of autoimmune chronic active hepatitis in childhood. *J Pediatr* 1984; 104:839-844.

27. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995; 19:1400-1412.

28. Khudak RD, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kupcovicz Keren H, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-435.

29. Ishak KG, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gubit F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696-699.

30. The French METAVIR Co-operative Study Group. Interobserver and intraobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 20:15-20.

31. Sarveer B, Ralhad R, Bhaloo WN. Azathioprine monotherapy for maintenance of remission in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43:363-366.

32. Mukherjee S, Somal MP. Noninvasive tests for liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 337-347.

33. Grewer OA, Weiskirchen R, Grewer AM. Erosion of hepatic fibrosis: fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fcton and reality. *J Cell Mol Med* 2007; 11:1031-1051.

34. Shaheen AA, Wei AJ, Myers RP. Fibrostat and FibroScan for the prediction of hepatic C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:2602-2606.

35. Myers RP, Sarinuer MH, Razu V, Flain A, Thibault V. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002; 38:222-230.

36. De Ledinger V, Le Bail B, Robinson L, Fournier C, Foucher J, Mehta V, et al. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate aminotransferase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 46:443-450.

37. Vergani D, Mal-Vergani G. Aetiological mechanisms of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 14:3306-3312.

38. Vergani D, Choudhuri K, Bogdanos DP, Mal-Vergani G. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002; 6:727-732.

39. Sohal R, Friedman SL. Hepatic fibrosis: role of hepatic stellate cells activation. *Med Gen Med* 2002; 4:27.

40. Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1:89-100.

41. Tzaja-Conyea R, Santos J, Cavalchini AM, Urbaniak E, Rivas L, Marinello A, et al. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 41:825-829.

42. Chaves SA, da Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Gomes TR, Castro MC, et al. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in four centers in Brazil. *Braz J Soc Bras Med Trop* 2000; 23:1-10.

43. Dwell M, Fildberg M, Moreno-Pinto M. Anti-hepatitis A virus frequency in adolescents at an industrial site, in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2006; 40:43-44.

44. Donatoni FT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22:303-304.

45. Coja AJ, Dault CO, Billmeyer PL, Campado EL, Faria G, Gottlieb AC, et al. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002; 37:302-308.

46. Ballester R, Park Y, Lindquist RL, Lemosso JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126:520-540.

47. Schulte-Krebs A, Preiner D, Popov Y, Baumochlager R, Lubnow Y, Pruski M, et al. Hepatitis C virus-exploiting hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterol* 2005; 129:246-250.

48. Ramen GA, Crawford DH, Powell JW, Walker HE, Ritcher LM, Halday JM. Hepatic stellate cells activation in genetic haemochromatosis. Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol* 1997; 26:584-592.

49. Ludenz IA, Farrell GC, Schlemmer R, Robertson GR. Lipin 3 is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37:206-213.

50. Lin S, Stevens NK, Ding X, Shen LL, Alvarez FA. Lipin 3 increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signaling transducer and activator of transcription 3 mechanism. *Mol Endocrinol* 2006; 20:3309-3318.

51. Cao Q, Ma KM, Lohar CS. Lipin 3 represses matrix metalloproteinase 1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2007; 48:124-133.

52. Dhanasekaran AM, Oakley F, Mann DA. The role and function of hepatic stellate cells apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2000; 10: 927-938.

53. Kawase T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:584-587.

54. Bedalov JF. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of differentiation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117: 539-548.

55. Dulfer JF, DeLathé R, Kaptein MM. Heterogeneity of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127:961-965.

56. Friedman SL. Transcriptional regulation of stellate cells activation. *Hepatology* 2006; 21:576-583.

57. De Minicis S, Soti C, Uchikawa H, Kluwe J, Zheng Y, Brenner DA, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cells activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132:1937-1946.

58. Murphy FF, Lee R, Zhou X, Ramanagoh S, Higgins B, Arthur MP, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibitors: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2005; 277:11058-11070.

59. Issa R, Williams C, Tim N, Kendall T, Arthur MP, Reichen J, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48:548-552.

4. COMENTÁRIOS, CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

O estudo atendeu ao questionamento inicial em relação à ativação das CHE e evolução da fibrose em fragmentos de biópsias hepáticas de crianças e adolescentes portadores de HAI tipo 1 realizadas antes do tratamento e após a remissão clínica. Demonstramos através de estudo imuno-histoquímico utilizando o anticorpo monoclonal específico anti α - AML, que as CHE encontram-se ativadas nessa enfermidade e que há uma diminuição na ativação dessas células após remissão clínico-laboratorial. Esses dados foram surpreendentes, visto não terem sido anteriormente relatados. Nossos resultados evidenciaram significativa redução nos escores de inflamação nas biópsias hepáticas pós-remissão, realizadas após intervalo médio de 24,18 meses. Houve redução nos escores de fibrose, apesar de não significativa do ponto de vista estatístico, chamando a atenção para a necessidade de seguimento histológico mais prolongado nesses pacientes. Esses resultados são apresentados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2 (Apêndice 1).

A idéia do trabalho surgiu durante o acompanhamento de pacientes portadores de HAI no ambulatório de Hepatologia do Hospital de Pediatria da UFRN (HOSPED). O conhecimento acerca da evolução da fibrose hepática nesse grupo de pacientes, fato importante para o seu seguimento clínico, despertou-nos o interesse em buscar a experiência de outros autores. Na literatura, estudos sobre o *follow-up* histológico de crianças e adolescentes portadores de HAI são escassos. Dufour *et al* (60) observaram reversão da cirrose após o tratamento de oito pacientes portadores de HAI, estando apenas um deles na faixa pediátrica e, após intervalo médio de biópsias de 63 meses, houve redução significativa tanto da inflamação quanto da fibrose. Em alguns grupos de crianças, devido à maior capacidade regenerativa, foi sugerido que o processo de reversão da cirrose pudesse acontecer em menor tempo do que em pacientes adultos (16).

Esses aspectos foram discutidos com a Dra. Ana Maria de Oliveira Ramos, professora do Departamento de Patologia da UFRN, orientadora do estudo e coordenadora de linha de pesquisa em Patologia e Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFRN. Responsável pela

análise histopatológica de biópsias hepáticas dos pacientes avaliados, a mesma sugeriu que estudássemos, nesse material, além dos escores de inflamação e fibrose, a ativação das CHE, que desempenham papel-chave na fibrogênese hepática. A escassez de dados a respeito dos primeiros aspectos e o desconhecimento de trabalhos semelhantes quanto à ativação das CHE na HAI promoveram a motivação para a investigação.

Feito o desenho do estudo e discutida com o bioestatístico a metodologia a ser empregada, elaboramos projeto a ser enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN. O cronograma inicialmente planejado foi prejudicado pela falta de financiamento para a realização do exame de imuno-histoquímica. Tal dificuldade técnica foi posteriormente solucionada com sua realização em laboratório privado (Laboratório Médico de Patologia Getulio de Oliveira Sales), sem ônus para os pesquisadores.

No período de março de 1997 a setembro de 2006, foram acompanhados no Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do HOSPED, em Natal, Brasil, 18 pacientes que preencheram os critérios estabelecidos para o diagnóstico de HAI baseados no sistema de escores proposto pelo Grupo Internacional de Hepatite Autoimune (31). Todos os pacientes preencheram escores para o diagnóstico definitivo da doença. Hepatite B e C bem como outras possíveis causas de hepatite foram excluídas, utilizando-se investigação apropriada. Os dados foram coletados através da revisão de prontuários médicos, tendo sido aplicado protocolo de pesquisa retrospectivamente até 2003 e prospectivamente após essa data.

Foram excluídos desse estudo dez pacientes: um menino de 7 anos de idade com síndrome “*overlap*” (colangite esclerosante com anticorpos ANA/AML positivos e HAI); um menino de 9 anos de idade com anticorpos ANA/AML positivos e já com cirrose ao diagnóstico, que morreu 3 meses após o diagnóstico; uma menina de 12 anos de idade com HAI tipo 1 que abandonou o acompanhamento 6 meses após o início do tratamento clínico; uma menina de 11 anos de idade com hepatite de células gigantes pós-infantil; dois meninos de 7 e 10 anos de idade com HAI tipo 2; uma menina de 7 anos com HAI tipo 1, mas com acompanhamento clínico de apenas três meses, e três meninas de 3, 10 e 12 anos de idade com HAI tipo 1 cujas amostras de tecido hepático foram consideradas inadequadas para o estudo imuno-histoquímico. Todos os 8 pacientes selecionados eram portadores de HAI

tipo 1 e possuíam no mínimo duas biópsias hepáticas, sendo a primeira ao diagnóstico inicial e as posteriores após a remissão clínico-laboratorial.

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN e preenchimento do termo de consentimento pelos responsáveis por cada um dos pacientes, foi preenchido protocolo (Apêndice 2) contendo dados clínico-laboratoriais que incluíam: sexo, idade ao diagnóstico, tempo médio de remissão clínica e bioquímica, duração do *follow-up* e níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gamaglutamiltranspeptidase (GGT), gamaglogulina, bilirrubina total e bilirrubina direta ao diagnóstico. Anticorpos ANA, AML e anti LKM-1 foram também pesquisados por técnicas padronizadas. Os resultados dos dados laboratoriais e sorológicos estão apresentados na Tabela 2 (Apêndice 3).

A revisão das lâminas arquivadas no Laboratório do Departamento de Patologia da UFRN, realizada pela orientadora e estritamente acompanhada pela pós-graduanda. Os blocos de parafina com os fragmentos de biópsia foram submetidos a novos cortes para a realização do exame de imuno-histoquímica, objetivando a marcação das CHE. A cooperação e o zelo dos funcionários do Departamento de Patologia da UFRN foram de fundamental importância.

Cada um dos 8 pacientes selecionados foi submetido a no mínimo duas biópsias hepáticas percutâneas por agulha: a primeira obtida na avaliação inicial do paciente (biópsia inicial) e a segunda (biópsia hepática pós-remissão) obtida no mínimo um ano após remissão clínica e bioquímica (66). Ao diagnóstico, os pacientes foram tratados com prednisona na dose de 2 mg/kg/dia (máximo de 60 mg/dia) e 1 a 2 mg/kg/dia (máximo de 75 mg/dia) de azathioprina (AZA) (67), seguidos por diminuição gradual das doses, de acordo com a resposta clínica e a atividade das aminotransferases. No momento da biópsia pós-remissão, todos os pacientes estavam recebendo tratamento clínico e encontravam-se em remissão clínica.

Todas as biópsias foram revisadas por uma única hepatopatologista, em estudo cego. O estadiamento da fibrose e o grau de inflamação foram considerados em escala de 0 a 4, utilizando-se o sistema de escores de Batts e Ludwig (68). (Anexo 2). Esse sistema de escores foi utilizado por sua praticidade e por ser

habitualmente utilizado no serviço de Patologia da UFRN. Diferente das hepatites virais, para as quais existem escores internacionalmente reconhecidos, como Knodell (69), Ishak (70) and METAVIR (71), não há um sistema específico para as HAI, porém a avaliação pelo sistema de escores de Batts e Ludwig permitiu a avaliação de toda a agressão inflamatória autoimune existente no tecido hepático, podendo servir para padronização em futuros estudos comparativos. Colorações de hematoxilina & eosina, tricrômio de Masson, reticulina (Gomori), Van Gieson (colágeno), PAS com e sem diastase, usadas rotineiramente em estudo microscópico de biópsias hepáticas foram também realizadas em todos os casos. Acompanhar de perto as revisões histológicas foi uma experiência bastante enriquecedora, por ampliar nossos conhecimentos nessa área e permitir maior compreensão de muitos aspectos da enfermidade e da própria interpretação de resultados da pesquisa. Reforçamos, assim, a importância do trabalho conjunto do hepatopatologista com o hepatologista clínico, tanto no diagnóstico como na avaliação evolutiva de hepatopatias crônicas.

A despeito do aumento da acurácia em métodos não invasivos para avaliação quantitativa da fibrose hepática como a elastografia (fibroscan) e fibrotest, tais alternativas têm sido utilizadas principalmente em pacientes portadores de hepatite crônica C e B (72, 73, 74, 75), com poucos estudos em crianças (76). Desta forma, a biópsia hepática continua sendo o método recomendado para o acompanhamento da evolução da fibrose na HAI (66, 77).

Estudar as CHE significou descobertas impactantes. Consideradas as células que desempenham papel-chave na fibrogênese hepática, sua ativação na HAI, que até então desconhecíamos, pôde ser demonstrada. Isto pode trazer perspectivas futuras e estimular o estudo dessas células, que potencialmente terão importância no

que tange ao tratamento e acompanhamento de doenças hepáticas crônicas. Ao mesmo tempo, o trabalho nos propiciou o melhor entendimento das complexas vias de suas ativação e desativação, até então aventadas.

Para a análise das CHE, realizamos estudo imunohistoquímico utilizando-se anticorpo monoclonal específico anti- α actina de músculo liso (α - AML) (Sigma Chemical Co, Poole, UK). A positividade para anti α -AML, caracterizando a ativação das CHE, foi quantificada utilizando-se um sistema digital e um analisador de imagens disponíveis no Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde/UFRN. A área total dos campos microscópicos nas secções histológicas coradas pela técnica de imunohistoquímica foi delimitada utilizando-se um microscópio óptico trinocular Olympus BX-45. As imagens foram capturadas com uma câmera digital Samsung e processadas em um microcomputador utilizando-se o programa Image Pro-plus version 3.0 (Media Cybernetics – LP, USA). O campo digitalizado foi dividido pelo programa em unidades de imagem denominadas picture elements ou pixels, com coordenadas definidas. Depois de selecionada a resolução desejada (X200), os impulsos ópticos foram digitalizados, resultando em uma imagem de cada campo que foi armazenada, sendo processada em sistema multimídia. Quatro imagens digitalizadas de cada biópsia hepática foram obtidas e examinadas para quantificação das CHE ativadas, cuja intensidade foi determinada pela média do número de pixels de hemossiderina por campo, sendo cada campo composto de 303.360 pixels (μm^2) (78). A avaliação histológica em amostras de tecido hepático de tamanho adequado, restrita a uma única observadora e a quantificação das CHE através de histomorfometria computadorizada permitiu uma maior confiabilidade dos resultados do presente estudo.

Os fatores genéticos relacionados à HAI têm sido bastante estudados. Susceptibilidade à HAI está relacionada aos genes do Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) - região do antígeno leucocitário humano (HLA) - no braço longo do cromossomo 6, especialmente genes codificando alelos HLA DRB1 (79). Na Europa e América do Norte, a susceptibilidade à HAI tipo 1 é conferida pela presença de HLA DR3 (DRB1*0301) e DR4 (DRB1*0401) (80). No Brasil, ao diagnóstico, os achados clínicos da HAI tipo-1 diferem de pacientes caucasóides dos Estados Unidos, por terem início de doença mais precoce, baixa frequência de doença autoimune concomitante, níveis mais elevados de aspartato aminotransferase e γ -globulina, maior ocorrência de anticorpos anti-músculo liso e menor frequência de anticorpos antinuclear. No nosso país, o HLA DR13 e DRB1*1301 são mais frequentes do que o HLA DR4 (30). Esses dados nos estimulam a determinar, no futuro, o perfil de HLA de nossos pacientes, com o objetivo de comparar suas manifestações clínicas e evolução com aquelas dos europeus e norte-americanos previamente estudados.

Considerada a importância dos fatores genéticos na HAI, com objetivo de obter ferramentas que pudessem permitir sua maior compreensão, bem como atualizar muitos conceitos, participamos em outubro de 2009 do “Curso Teórico-Prático de Genética Médica” como parte do “Curso de Especialização em Endocrinologia Pediátrica” do HOSPED, coordenado pelo Doutor Ricardo Fernando Arrais, Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da UFRN. O contato com professores dos Departamentos de Biologia e Farmácia da UFRN em aulas teórico-práticas foi de fundamental importância, não só para o trabalho, mas principalmente para nossa formação, além de nos ter despertado o interesse em ampliar nossos estudos, incluindo esses aspectos.

Mecanismos fibrogênicos específicos de algumas doenças têm sido descritos, com ativação das CHE, como na hepatite C, hepatite C e HIV, na hemocromatose e na esteatohepatite não-alcoólica, conforme anteriormente referido (47, 48, 49, 50, 51, 52, 53). A fisiopatologia da HAI é complexa e envolve predisposição genética, exposição prévia a antígenos (autoantígenos), fatores desencadeadores e desregulação do sistema immune (54). Demonstramos, de maneira pioneira, que as CHE encontram-se ativadas na HAI. Apesar dos avanços acerca dos conhecimentos da fisiopatologia da HAI, novos modelos são necessários para se entender os mecanismos pelos quais as CHE podem estar envolvidas nesse processo.

Nas biópsias hepáticas pós-remissão, obtidas após tratamento, com intervalo de tempo médio entre as biópsias de 24,18 meses, observamos redução significativa na ativação das CHE. O destino das CHE durante o processo de resolução da fibrose hepática é incerto, mas pode incluir reversão ao fenótipo quiescente e/ou clareamento seletivo por meio de apoptose. As vias de que regulam a sobrevivência e morte dessas células permanecem ainda pouco compreendidas (56, 57, 58, 63).

Em adultos portadores de HAI tratados com corticosteróides, regressão da fibrose e reversão da cirrose têm sido relatadas (10, 14, 15). Nos pacientes em que tais eventos foram evidenciados, o intervalo médio de tempo entre as biópsias foi de 4 a 14 anos, demonstrando que se trata de um processo lento. Em crianças e adolescentes, há poucos pacientes documentados. Dufour et al (60) observaram reversão da cirrose após o tratamento de 8 pacientes portadores de HAI (incluindo uma criança). Após intervalo médio de biópsias de 63 meses, houve redução significativa tanto da inflamação quanto da fibrose. Há poucos estudos em crianças portadoras de HAI tipo 1 com relação à evolução da fibrose em biópsias pós-remissão. Dificuldades técnicas e metodológicas adicionam algumas limitações a

esses estudos. As considerações acima mencionadas tornam os achados de nosso estudo relevantes. Foi sugerido que o processo de reversão da cirrose em alguns grupos de crianças possa ocorrer em um tempo menor que em adultos, devido à grande capacidade de regeneração do fígado (16). Observamos regressão da fibrose, apesar de não significativa, após intervalo médio de 24,18 meses entre as biópsias. O fato de não termos observado redução significativa da fibrose nas biópsias hepáticas pós-remissão, após intervalo médio de 24,14 meses, aponta para a necessidade de um seguimento mais prolongado, com coleta de amostras em tempo mais alargado, para que proposições como essas possam ser confirmadas.

A despeito do tratamento imunossupressor e da remissão clínico-laboratorial, alguns pacientes com HAI evoluem para cirrose (10,11). Os determinantes da progressão da fibrose incluem fatores ambientais e genéticos; há esforços no momento para definir polimorfismos específicos e a possível correlação dos mesmos com as taxas de progressão da fibrose (44, 45, 63). No nosso estudo, 1 de 8 dos pacientes piorou os escores de fibrose.

Por outro lado, redução significativa da atividade necroinflamatória nas biópsias hepáticas pós-remissão encontrada em nosso estudo, foi também observada em crianças portadoras de HAI tratadas com corticosteróides e imunossupressores (12), com intervalo médio de biópsias de 2 anos.

As informações geradas pelo estudo foram divulgadas na forma de pôsteres no Congresso Mundial de Gastroenterologia e Hepatologia Pediátrica, realizado em Foz de Iguaçu-Brasil, no período de 16 a 20 de agosto de 2008. (Apêndice 4). Os resultados foram também informados aos pacientes portadores de HAI, no sentido e confirmar a importância do acompanhamento clínico e a necessidade do follow-up histológico. Atualmente são acompanhadas 13 crianças e adolescentes portadores

de HAI no ambulatório de Hepatologia do HOSPED, todos clinicamente bem, exceto uma adolescente de 18 com HAI tipo um associada à síndrome nefrótica e plaquetopenia de difícil controle, e outra de 16 anos, também com HAI tipo 1, falecida em dezembro de 2008, devido a cirrose descompensada, sem conseguir transplante hepático depois de 1 ano em fila de espera.

A experiência no doutorado proporcionou-nos crescimento intelectual e relevante aquisição de conhecimentos científicos, além de nos despertar o interesse em continuar estudando e pesquisando aspectos da HAI e outras hepatopatias crônicas.

A pesquisa trouxe a oportunidade de aprofundamento sobre o tema em análise, além de proporcionar aprimoramento da prática de pesquisa e ampliar nossa base de informação e formação. Todo o apoio de recursos humanos técnicos necessários ao bom andamento da pesquisa foi fundamental e pudemos contar com a colaboração de professores de várias áreas da UFRN, dentre eles, pediatra gastroenterologista, patologista, biólogo e estatístico. A execução desse projeto preencheu, assim, os requisitos da multi e interdisciplinaridade, promovendo de forma ampla as relações entre as referidas especialidades, acentuando a importância do estudo ora apresentado e atendendo aos princípios do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFRN.

5. REFERÊNCIAS

1. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:3-15.
2. Zhao L, Burt AD. The diffuse stellate cell system. *J Mol Histol* 2007;38:53-64.
3. Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; 29:830-847.
4. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328:1828-1835.
5. Bortolotti F, Guido M, Cadrobbi P, Crivellaro C, Bartolacci S, Rugge M et al. Spontaneous regression of hepatitis B virus associated liver cirrhosis developed in childhood. *Dig Liver Dis* 2004; 37:964-967.
6. Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burkhardt E, et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatology* 2001; 35:749-755.
7. Poynard T, McHutchison J, Davis GL, Esteban-Mur R, Goodman Z, Bedossa P, et al. Impact of interferon alpha-2b and ribavirin on progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32:1131-1137.
8. Falkmer S, Samuelson G, Sjolín S. Penicillamine-induced normalization of clinical signs, and liver morphology and histochemistry in a case of Wilson's disease. *Pediatrics* 1970; 45:260-268.v
9. Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Ann Intern Med* 1997; 126: 682-688.
10. Schvarcz R, Glaumann H, Weiland O. Survival and histological resolution of fibrosis in patients with autoimmune chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1993; 18:15-23.

11. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-Year Experience. *Hepatology* 1997; 25: 541-547.
12. Saadah OI, Smith AL, Hardikar W. Outcome of autoimmune hepatitis in children. *J. Gastroenterol Hepatol* 2001; 16:1297-1302.
13. Czaja AJ, Carpenter HA. Progressive fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2004; 39:1631-1638.
14. Cotler SJ, Jakate S, Jensen DM. Resolution of cirrhosis in autoimmune hepatitis with corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32:428-430.
15. Czaja AJ, Carpenter HA. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J Hepatology* 2004; 40:646-652.
16. Bortolotti F, Guido M. Reversal of Liver Cirrhosis: A Desirable Clinical Outcome and Its Pathogenic Background. *J. Pediatr Gastroenterol. Nutr* 2007; 40:401-406.
17. Vergani D, Mieli-Vergani G. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2004; 50:113-23.
18. Cuadrado A, Aresti S, Cortés MA, Gómez-Ortega JM, Salcines JR. Autoimmune hepatitis and agranulocytosis. *Dig Liver Dis* 2009;41:14-6.
19. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children: what is different from adult AIH? *Semin Liver Dis* 2009; 29:297-306.
20. Maggiore G, Bernard O, Homberg JC, Hadchouel M, Alvarez F, Hadchouel P, et al. Liver disease associate with anti-liver-kidney microsome antibody in children. *J Pediatr* 1986; 108:399-404.
21. Gentile M, Verta M, Vigna E, Lucia E, Mazzone C, Perugini D, et al. Autoimmune hemolytic anemia concomitant with sequential autoimmune hepatitis-primary biliary cirrhosis overlap syndrome and Hashimoto's thyroiditis: a new entity of autoimmune polyendocrine syndrome. *J Endocrinol Invest* 2009; 32:287-8.
22. Deen ME, Porta G, Fiorot FJ, Campos LM, Sallum AM, Silva CA. Autoimmune hepatitis and juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:747-51.
23. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997; 25: 541-547.

24. Maggiore G, Veber F, Bernard O et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17:376-81.
25. Porta G, Gayotto LC, Alvarez F. Anti-liver-kidney microsome antibody-positive autoimmune hepatitis presenting as fulminant liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 11:138-140.
26. Alvarez F. Autoimmune Hepatitis and Primary Sclerosing Cholangitis In Bezerra JA, Balistreri WF e Gitlin N. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2006.p89-107.
27. Ramakrishna J, Johnson AR, Banner BF. Long-term minocycline use for acne in healthy adolescents can cause severe autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43:787-90.
28. Wen L, Ma Y, Bogdanos DP, Wong FS, Demaine A, Mieli-Vergani G, Veergani D. Pediatric autoimmune disease: the molecular basis of humoral and cellular immunity. *Curr Mol Med* 2001; 1:379-89.
29. Miele-Vergani G, Vergani D. Immune mechanism in Pediatric Liver Disease. In Suchy FJ. *Liver Disease in Children*. 1st ed. St Louis: Ed. Mosby; 1987.p173-80.
30. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cançado EL, Porta G, Goldberg AC et al. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002; 37: 302-308.
31. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al . International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999 31:929-938.
32. Yeoman AD; Westbrook RH; Al-Chalabi T; Carey I; Heaton ND; Portmann BC; Heneghan MA. Diagnostic value and utility of the simplified International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) criteria in acute and chronic liver disease. *Hepatology* 2009; 50:538-45.
33. Mieli-Vergani G, Vergani D. Progress in pediatric autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 1994; 14:282-8.
34. Mieli-Vergani G, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, McFarlane IG, Mowat AP, Vergani D. Different immune mechanisms leading to autoimmunity in primary sclerosing

cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis of childhood. *Hepatology* 1989; 9:198-203.

35. Czaja AJ. Rapidity of treatment response and outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2009; 51:161-7.
36. Banerjee S, Rahhal R, Bishop WP. Azathioprine monotherapy for maintenance of remission in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43:353-356.
37. Czaja AJ, Bianchi FB, Carpenter HA, Kraitl EL, Lohse AW, Manns MP et al. Treatment challenges and investigational opportunities in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2005 41:207-15.
38. Granito A; Muratori P; Ferri S; Pappas G; Quarneti C; Lenzi M; Bianchi FB; Muratori L. Diagnosis and therapy of autoimmune hepatitis. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:847-60.
39. Aw MM; Dhawan A; Samyn M; Bargiota A; Mieli-Vergani G. Mycophenolate mofetil as rescue treatment for autoimmune liver disease in children: a 5-year follow-up. *J Hepatol* 2009;51:156-60.
40. Porta G . Hepatite autoimmune. In Ferreira CT, Carvalho E e Silva LR. *Gastroenterologia e Hepatologia em Pediatria*. 1^a Ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi;2003.p573-80.
41. Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 36:479-497.
42. Tan HH, Fiel MI, del Rio Martin J, Schiano TD. Graft rejection occurring in post-liver transplant patients receiving cytotoxic chemotherapy: a case series. *Liver Transpl* 2009; 15:634-9.
43. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 28:2247-2250.
44. Guo CJ; Pan Q; Cheng T; Jiang B; Chen GY; Li DG. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J* 2009;276:5163-76.

45. Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1:98-105.
46. Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; 29:830-847.
47. Gibelli NE, Tannuri U, Mello ES. Immunohistochemical studies of stellate cells in experimental cholestasis in newborns and adults rats. *Clinics* 2008;63:689-94.
48. Bataller R, Paik Y, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126:529–540.
49. Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, Bartenschlager R, Lohmann V, Pinzani M, Schuppan D. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterol* 2005; 129:246-258.
50. Allison RD, Katsounas A, Koziol DE, Kleiner DE, Alter HJ, Lempicki RA, Wood B, Yang J. et al. Association of interleukin-15-induced peripheral immune activation with hepatic stellate cell activation in persons coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *J Infect Dis* 2009;200:619-23.
51. Ramm GA, Crawford DH, Powell LW, Walker NI, Fletcher LM, Haliday JW. Hepatic stellate cell activation in genetic haemochromatosis. Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J Hepatol* 1997; 26:584-592.
52. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37:206-213.
53. Lin S, Saxena NK, Ding X, Stein LL, Anania FA. Leptin increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signal transducer and activator of transcription 3 mechanism. *Mol Endocrinol* 2006; 20:3376-388.
54. Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2007; 46:124-133.
55. Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:3306-3312.

56. Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1:98-105.
57. Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and the regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10:927-939.
58. Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:S84-S87.
59. Iredale, JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117:539-548.
60. Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY, Li DG. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J* 2009;276:5163-76.
61. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127:981-985.
62. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJP et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277:11069-11076.
63. Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJP, Reichen J, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48:548-557.
64. Sadafi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis: role of hepatic stellate cells activation. *Med Gen Med* 2002; 4: 27.
65. Friedman SL. Transcriptional regulation of stellate cells activation. *Hepatology* 2006; 21: S79-83.
66. De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cells activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132: 1937-1946.

67. Suchy FJ. Chronic Hepatitis. In: Balistreri WF; Stoker JT. Pediatric Hepatology. New York: Hemisphere Publishing Corporation. 1987. p. 273-284.
68. Maggiore G, Bernard O, Hadchouel M, Hadchouel P, Odievre M, Alagille D. Treatment of autoimmune chronic active hepatitis in childhood. *J Pediatr* 1984; 104:839-844.
69. Batts KP, Ludwig J. Chronic Hepatitis: An Update on Terminology and Reporting. *Am J Surg Patol* 1995; 19:1409-1417.
70. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz Kiernan N. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-435.
71. Ishak KG, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696-699.
72. The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 20: 15-20.
73. Mukherjee S, Sorrell MF. Noninvasive tests for liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 337-347.
74. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality. *J Cells Mol Med* 2007; 11: 1031-1051.
75. Shaheen AA, Wan AF, Myers RP. Fibrotest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:2589-2600.
76. Myers RP, Tainturier MH, Ratzu V, Piton A, Thibault V. Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39:222-230.
77. de Lédinghen V, Le Bail B, Rebouissoux L, Fournier C, Foucher J, Miette V et al. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 2007; 45:443-450.

78. Jatobá CAN, Rezende AA, Rodrigues SJP, de Almeida CMM, Almeida MG, Ramos AMO, et al. Liver iron overload induced by tamoxifen in diabetic and non-diabetic female rats. *Biometals* 2007; 21(2):171-178.
79. Carpenter HA, Czaja AJ. The role of histologic evaluation in the diagnosis and management of autoimmune hepatitis and its variants. *Clin Liver Dis* 2002; 6:685-705.
80. Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:3306-3312.
81. Donaldson PT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 353-364.

ANEXOS

Anexo 1

Diagnostic Criteria for Autoimmune Hepatitis: Minimum Required Parameters

From Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al: International Autoimmune Hepatitis Group report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 31:929-938, 1999.

Parameters	Score
History	
Sex	
Female	+2
Male	0
Alcohol average consumption	
< 25g/day	+2
>60 g/day	-2
History of hepatotoxic drug use	
Yes	-4
No	+1
Other autoimmune diseases	
Present	+2
Absent	0
Serum Biochemical Studies	
Serum ALP:ALT ratio	
<1.5	+2
>3.0	-2
Serum total globulin, gamma globulin, or IgG	
>2 × normal	+3
1.5-2 × normal	+2
1.0-1.5 × normal	+1
Normal	0
Serology Studies	
ANA, ASMA, or LKM-1	
>1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
<1:40	0
AMA	
Negative	0
Positive	-4
Viral hepatitis markers	

Parameters	Score
Negative	+3
Positive	-4
Other autoantibodies	
Present	+2
Absent	0
HLA-DR3 or DR4	
Present	+1
Absent	0
<i>Treatment Response</i>	
Complete remission	+2
Remission with subsequent relapse	+3
<i>Histology</i>	
Interface hepatitis	+3
Lymphoplasmacytic infiltrate	+1
Hepatocyte rosetting	+1
None of the above	-5
Biliary changes	-3
Other changes	-3
<i>Interpretation of Aggregate Scores</i>	
Before therapy:	
>15	Definite AIH
10-15	Probable AIH
After therapy:	
>17	Definite AIH
12-17	Probable AIH

Anexo 2

Escores histológicos de Batts and Ludwig

ACTIVITY GRADES

Grade 0 - portal inflammation only/no lymphocytic piecemeal necrosis/no lobular inflammation and necrosis

Grade 1 - minimal and patchy portal inflammation/minimal or occasional spotty necrosis

Grade 2 - mild portal inflammation involving some or all the portal tract/mild lobular inflammation and little hepatocellular damage

Grade 3 - moderate portal inflammation involving all portal tract/moderate lobular inflammation with noticeable hepatocellular change;

Grade 4 - severe portal inflammation/severe lobular inflammation and necrosis, with prominent diffuse hepatocellular damage

HISTOLOGICAL STAGE

Grade 0 - no fibrosis

Grade 1 - fibrosis portal expansion

Grade 2 - periportal or rare portal–portal septa

Grade 3 - fibrous septa with architectural distortion, no obvious cirrhosis

Grade 4 – cirrhosis

APÊNDICE 1

Apêndice 1.1

TABELA 1 - Achados Histológicos (Escores de Batts e Ludwig) de Atividade Inflamatória Hepática (0-4), Fibrose (0-4) e Achados Imunohistoquímicos de Ativação das Células Hepáticas Estreladas (μm^2) em Biópsias Hepáticas Pareadas Antes do Tratamento e Após a Remissão Clínica e Laboratorial de 8 Crianças Portadoras de Hepatite Autoimune tipo 1.

Achados histológicos	Antes	Depois	P-valor *
IP	2,6 \pm 0,74	1,3 \pm 0,89	0,027709
IPP	3,00 \pm 0,76	1,4 \pm 1,06	0,027709
IL	2,8 \pm 1,04	0,9 \pm 0,99	0,017961
Fibrose	2,5 \pm 0,93	2,0 \pm 0,53	0,201244
CHE	3491,93 \pm 2051,48	377,91 \pm 439,47	0,0117

* Teste de Wilcoxon , nível de significância de $p < 0.05$

IP: inflamação portal; IPP: inflamação periportal/periseptal ; IL: inflamação lobular, CHE: Células Hepáticas Estreladas.

Apêndice 1.2

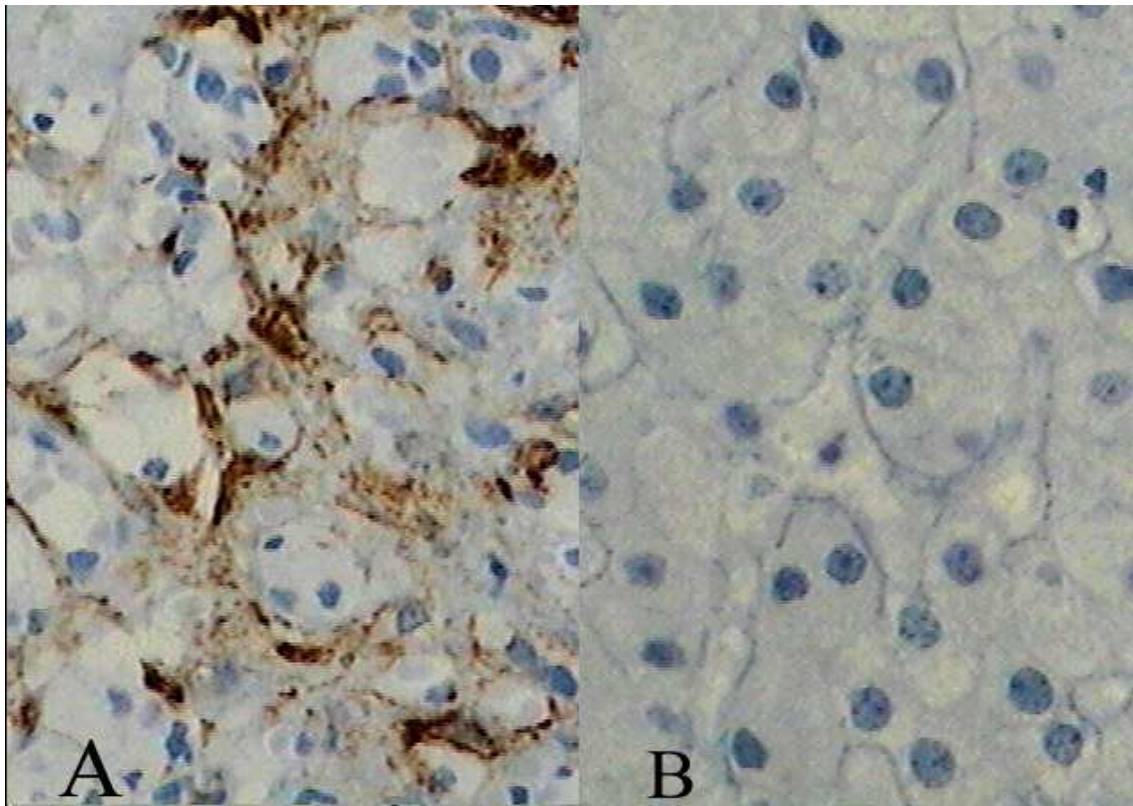


Figura 1 – Imuno-histoquímica da expressão da actina-de músculo liso (anti-músculo liso) na biópsia hepática inicial antes do tratamento (A) e após remissão clínica (B) (aumentox400).

Apêndice 1.3

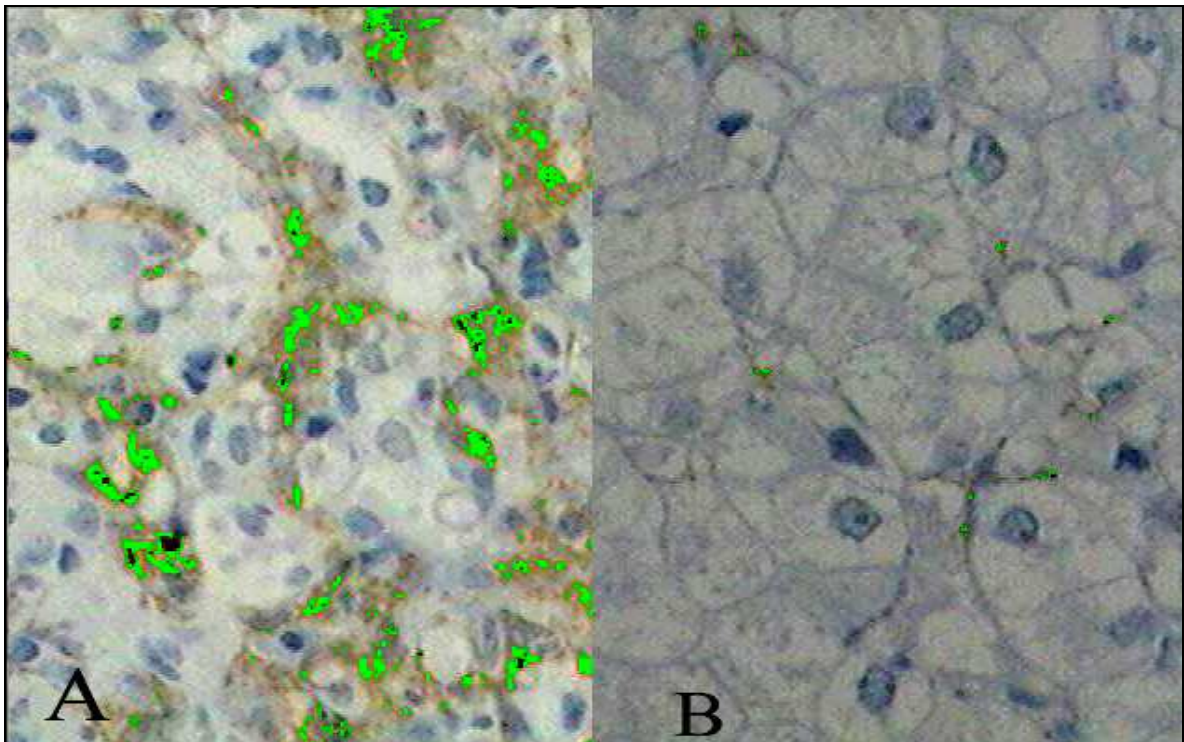


Figura 2 - Imuno-histoquímica (em verde) demonstrando forte expressão de actina de músculo liso na biópsia hepática inicial antes do tratamento (A) e sua quase ausência na biópsia hepática após a remissão clínica (B) (aumento X400).

Apêndice 1.4

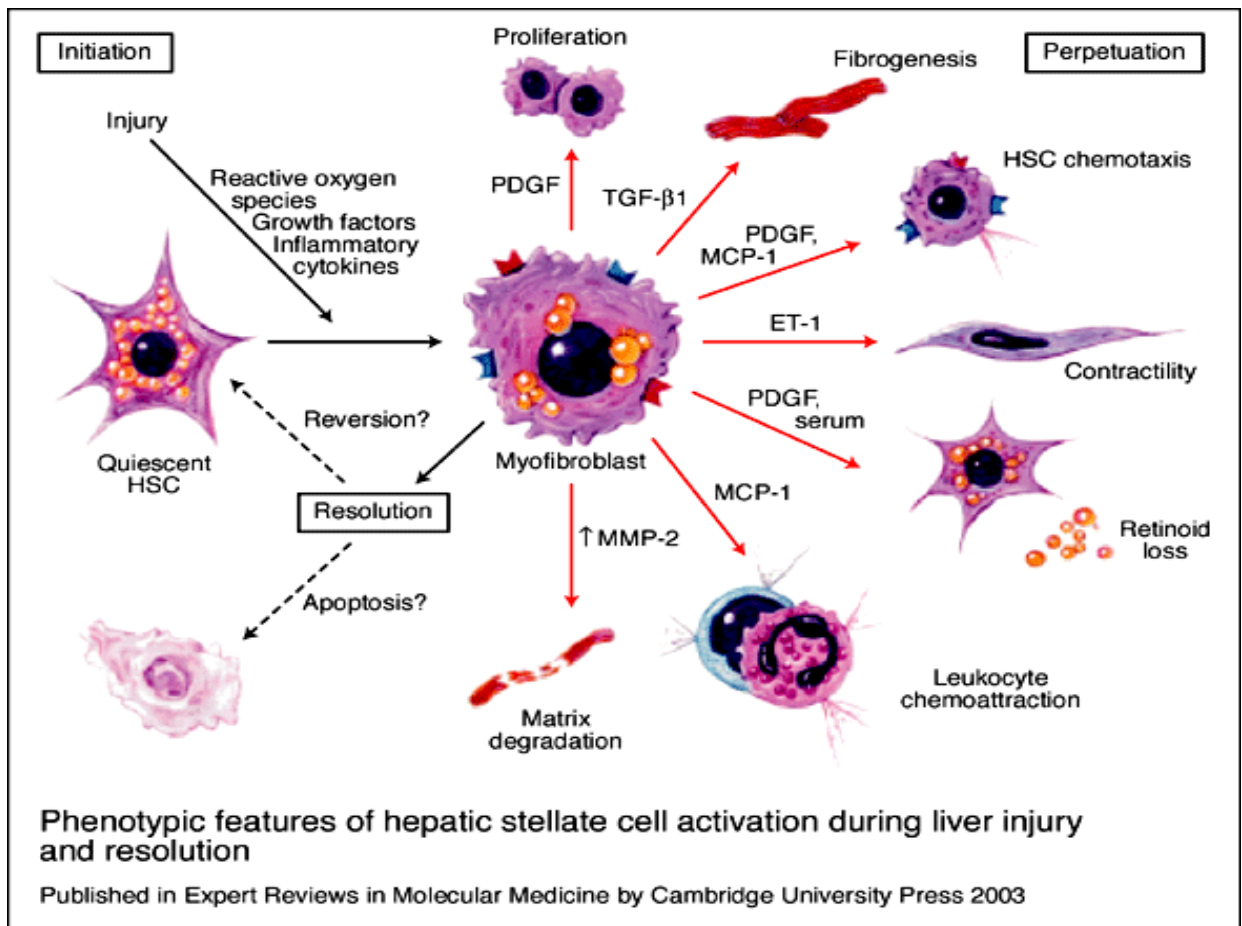


Figura 3 – Achados fenotípicos da ativação das CHE durante as fases de injúria e resolução da lesão hepática.

Apêndice 2

PROTOCOLO CLÍNICO-LABORATORIAL E ANÁTOMO-PATOLÓGICO

PROJETO DE PESQUISA: HEPATITE AUTO-IMUNE

6

01. PROTOCOLO CLÍNICO-LABORATORIAL

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO				
Nome:		Sexo <input checked="" type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino		
Data de Nascimento: 28 / 06 / 94		REGISTRO: 107 376		
DADOS CLÍNICOS				
Idade do início dos sintomas (IIS):		3a. 8 meses (46)		
Idade do diagnóstico (ID):		4a. 2 meses (50)		
Forma de apresentação clínica: () Aguda <input checked="" type="checkbox"/> Crônica () Fulminante				
AVALIAÇÃO LABORATORIAL INICIAL				
ALT	() normal	<input checked="" type="checkbox"/> elevado	660	U/L
AST	() normal	() elevado	1560	U/L
GGT	() normal	() elevado	56	U/L
BT	() normal	() elevado	5,45	mg/dL
BD	() normal	() elevado	4,20	U/L
Gamaglobulina	() normal	() elevado	2,33	gdL
FAN	() negativo	<input checked="" type="checkbox"/> positivo	1:160	
AML	<input checked="" type="checkbox"/> negativo	() positivo		
Anti-LKMI	<input checked="" type="checkbox"/> negativo	() positivo		
REMISSÃO LABORATORIAL APÓS TRATAMENTO				
ALT	18	3	Meses	
AST	28	3	Meses	
GGT			Meses	

IgG UVA (+) auto-ABs (+)
 IgM UVA (-)

Av. Cel. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n - Natal-RN, CP 244, CEP 59010-180
 Telefax: (84) 215-42-20 E-mail: ppgcna@ccs.ufm.br

02. PROTOCOLO ANATOMO-PATOLÓGICO

1ª. BIÓPSIA - N. <u>9807822</u> DATA: <u>18/07/1998</u>	
GRAU DE ATIVIDADE	
Infiltrado inflamatório portal/septal	<input type="checkbox"/> grau 0 <input type="checkbox"/> grau 1 <input type="checkbox"/> grau 2 <input checked="" type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4
Atividade periportal/perisseptal	<input type="checkbox"/> grau 0 <input type="checkbox"/> grau 1 <input type="checkbox"/> grau 2 <input type="checkbox"/> grau 3 <input checked="" type="checkbox"/> grau 4
Atividade parenquimatosa	<input type="checkbox"/> grau 0 <input type="checkbox"/> grau 1 <input checked="" type="checkbox"/> grau 2 <input type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4
ESTADIAMENTO (fibrose/cirrose)	
<input type="checkbox"/> grau 0 <input type="checkbox"/> grau 1 <input type="checkbox"/> grau 2 <input checked="" type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4	
OUTROS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	
Presença de Plasmócitos	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Presença de Pseudorosetas	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Bilirrubinoestase	<input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não
Colestase	<input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não
Transformação gigante celular	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA (CHE)	
1ª. Biópsia: <input type="checkbox"/> CHE ativadas	
2ª. BIÓPSIA - N. <u>122490</u> DATA: <u>28/02/2000</u>	
GRAU DE ATIVIDADE	
Infiltrado inflamatório portal/septal	<input type="checkbox"/> grau 0 <input type="checkbox"/> grau 1 <input checked="" type="checkbox"/> grau 2 <input type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4
Atividade periportal/perisseptal	<input type="checkbox"/> grau 0 <input checked="" type="checkbox"/> grau 1 <input type="checkbox"/> grau 2 <input type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4
Atividade parenquimatosa	<input type="checkbox"/> grau 0 <input checked="" type="checkbox"/> grau 1 <input type="checkbox"/> grau 2 <input type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4
ESTADIAMENTO (fibrose/cirrose)	
<input type="checkbox"/> grau 0 <input type="checkbox"/> grau 1 <input checked="" type="checkbox"/> grau 2 <input type="checkbox"/> grau 3 <input type="checkbox"/> grau 4	
OUTROS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	

PROJETO DE PESQUISA: HEPATITE AUTO-IMUNE

Presença de Plasmócitos	() Sim	(x) Não
Presença de Pseudorosetas	() Sim	(x) Não
Bilirrubinoestase	() Sim	(x) Não
Colestase	() Sim	(x) Não
Transformação gigante celular	() Sim	(x) Não
AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA (CHE)		
2ª. Biópsia: () CHE ativadas		

OBS: O grau de ativação das células hepáticas será quantificado através de histomorfometria computadorizada, baseando-se na imunorreação com os anticorpos estudados (desmina/actina de músculo liso).

APÊNDICE 3

Tabela 2. Achados laboratoriais e sorológicos ao diagnóstico de 8 crianças portadoras de Hepatite Autoimune tipo 1.

TIPO DE TESTE		
Laboratoriais	MÉDIA±DP	LIMITES
ALT (nl ≤ 27 UL)	1120±566	91-2365
AST (nl ≤ 27 UL)	896±429	107-1820
GGT (nl<50)	108,2±86,4	33-298
Bilirrubina total (mg/dL)	10,8±8,14	1,7-23,7
Bilirrubina direta (mg/dL)	8,8±6,8	1,0-17,8
Gamaglobulina (g/dL)	2,4±0,7	1,2-3,6
Sorológicos	N=8	LIMITES
Anticorpo (AC) antinuclear (≥ 1:40)	6/8	80-640
Anticorpo anti-músculo liso (≥ 1:40)	4/8	40-640
AC Antinuclear e anti-músculo liso	2/8	

APÊNDICE 4

RESUMOS DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Evolution of hepatic fibrosis in children with type I autoimmune hepatitis: histological findings before treatment and after clinical remission.

Jussara M C Maia**, Hécio de S Maranhão, Lauro V de Sena, Luiz R M da Rocha, Ítalo A de Medeiros, Ana Maria de O Ramos***

Objectives: Fibrosis regression can be observed in various chronic liver diseases, by eliminating the etiologic agent or pathogenic base. In autoimmune hepatitis (AIH), more evidence is needed about its evolution. The aim of this study was to analyze the evolution of fibrosis and inflammation in liver biopsies of children with type I AIH, comparing the findings before treatment and after clinical remission.

Methods: We analyzed 16 liver biopsy samples from 8 children with type I AIH, paired before treatment and after clinical remission (mean interval = 24 ± 18 months). The fibrosis and inflammation findings were expressed as scores between 0 and 4 (Batts and Ludwig) and compared using Wilcoxon's test.

Results: Mean age at diagnosis was 8.1 ± 3 years, with a predominance of girls (87.5%). No significant decrease in fibrosis scores was found (2.5 ± 0.93 versus 2.0 ± 0.53 , $p = 0.2012$). However, there was significantly reduced inflammation: portal (2.6 ± 0.74 versus 1.3 ± 0.89 , $p = 0.0277$), periportal/periseptal (3.0 ± 0.76 versus 1.4 ± 1.06 , $p = 0.0277$) and lobular (2.8 ± 1.04 versus 0.9 ± 0.99 , $p = 0.0179$).

Conclusions: Despite significantly decreased inflammation in post-remission liver biopsies of children with type I AIH, the persistence of fibrosis suggests the need for a longer histological follow-up period, owing to the risks of potential evolution toward cirrhosis.

- Postgraduate Program in Health Sciences of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. Department of Pediatrics of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. Department of Pathology of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. Department of Surgery of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. ** Tese de Aluna de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Natal, Rio Grande do Norte (RN) – Brasil. *** Professora Orientadora.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Activation of Hepatic Stellate Cells in Children with Type I Autoimmune Hepatitis:
immunohistochemical Study of Liver Biopsies Before Treatment and After Clinical
Remission.***

Jussara M C Maia**, Hécio de S Maranhão, Lauro V de Sena, Luiz R M da Rocha, Ítalo A de
Medeiros, Ana Maria de O Ramos***

Objectives: the activation of hepatic stellate cells (HSC) is considered the most important event of hepatic fibrogenesis, but is unknown in autoimmune hepatitis (AIH). The aim of the study was to assess the activation of HSC in children with type I AIH, before treatment and after clinical remission.

Methods: we analyzed 16 liver biopsy samples from 8 children with type I AIH, paired before treatment and after clinical remission (mean interval = 24 ± 18 months), using an immunohistochemical study with an anti- α smooth muscle actin (anti- α SMA) antibody. The positivity for this antibody, characterizing HSC activation, was quantified using a digitalizing system and image analyzer (Image Pro Plus software, version 3.0- Media Cybernetics – LP, USA). Wilcoxon's test was used to compare the analyses.

Results: mean age at diagnosis was 8.1 ± 3 years, with a predominance of girls (87.5%). Anti- α SMA antibodies were expressed in the HSC in all the initial biopsies (3491.93 ± 2051.48) and a significant reduction was found in post-remission biopsies (377.91 ± 439.47) ($p = 0.0117$). were expressed in HSC in the initial biopsies, with a significant reduction after remission ($p = 0.0117$).

Conclusions: The confirmation of HSC activation and its subsequent reduction after clinical remission provides important perspectives in the follow-up of fibrosis evolution in patients with AIH.

* Postgraduate Program in Health Sciences of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. Department of Pediatrics of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. Department of Pathology of the Federal University of Rio Grande do Norte,

Natal, Brazil. Department of Surgery of the Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. ** Tese de Aluna de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Natal, Rio Grande do Norte (RN) – Brasil. *** Professora Orientadora.

ABSTRACT

The activation of hepatic stellate cells (HSC) is considered the most important event in hepatic fibrogenesis. The precise mechanism of this process is unknown in autoimmune hepatitis (AIH), and more evidence is needed on the evolution of fibrosis. The aim of this study was to assess these aspects in children with type 1 AIH. We analyzed 16 liver biopsy samples from eight patients, paired before treatment and after clinical remission, performed an immunohistochemical study with anti- α -actin smooth muscle antibody and graded fibrosis and inflammation on a scale of 0–4 (Batts and Ludwig scoring system). We observed there was no significant reduction in fibrosis scores after 24 ± 18 months (2.5 ± 0.93 vs. 2.0 ± 0.53 , $P = 0.2012$). There was an important decrease in inflammation: portal (2.6 ± 0.74 vs. 1.3 ± 0.89 , $P = 0.0277$), periportal/periseptal (3.0 ± 0.76 vs. 1.4 ± 1.06 , $P = 0.0277$), and lobular (2.8 ± 1.04 vs. 0.9 ± 0.99 , $P = 0.0179$). Anti- α -actin smooth muscle antibodies were expressed in the HSC of the initial biopsies ($3491.93 \pm 2051.48 \text{ Im}^2$), showing a significant reduction after remission ($377.91 \pm 439.47 \text{ Im}^2$) ($P = 0.0117$). HSC activation was demonstrated in the AIH of children. The reduction of this activation after clinical remission, which may precede a decrease in fibrosis, opens important perspectives in the follow-up of AIH.

Keywords: keywords: hepatic stellate cells; fibrosis; autoimmune hepatitis; children.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)