

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA
SAÚDE DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Maria Fernanda Silva Rocha

Unidade Local de Saúde de Matosinhos, EPE – Hospital Pedro Hispano

Determinação de Autoanticorpos em
doentes com suspeita de Hepatite
Autoimune e Cirrose Biliar Primária

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica

ORIENTADOR INSTITUCIONAL: PROF. DOUTORA CRISTINA PRUDÊNCIO

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto
– Professora coordenadora da área Científica de Ciências Químicas e das
Biomoléculas.

CO-ORIENTADOR: DR^a. ROSÁRIO ALVES

Unidade Local de Saúde de Matosinhos, E.P.E. – Médica Especialista em Patologia
Clínica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Pedro Hispano.

Dezembro de 2012

Agradecimentos

À Dr^a. Rosário Alves, pela sua orientação e tempo dispensados na elaboração deste trabalho, pelo seu apoio, transmissão de conhecimentos científicos e pela sua amizade.

Ao Dr. Carlos Soares, pela colaboração e opinião no desenho deste trabalho, pela sua disponibilidade e amizade.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, pelo seu tempo tão precioso dispensado na orientação deste trabalho, pela transmissão de conhecimentos e pelo seu exemplo em alcançar os objetivos que por vezes nos parecem impossíveis.

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes, por todo o carinho, amizade, incentivo e apoio desde o primeiro momento na elaboração deste trabalho.

À IZASA[®], na pessoa do Dr. Bruno Garganta pelo patrocínio dos kit's de Imunoblot, sem a sua amizade não teria conseguido realizar este trabalho.

À Dr^a. Liliana da ISODER[®] pelo apoio imprescindível na pesquisa bibliográfica, pela sua disponibilidade e ajuda na fase experimental e principalmente pela sua amizade.

Às minhas colegas do serviço de imunologia, Susana, Branca e Marisa, e á Susana Pina, um agradecimento especial pelo apoio e disponibilidade que sempre tiveram em ajudar-me.

À minha amiga Beta, que sempre me deu força, coragem e incentivo nesta minha empreitada, sempre com uma palavra amiga, mesmo à distância está sempre tão perto e no meu pensamento.....Obrigado por seres minha AMIGA!

Aos meus pais que fizeram com que esta realidade fosse possível e em especial à minha mãe que está presente nesta fase da minha vida e é o meu pilar, obrigada pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus filhos, Inês e Pedro muito obrigada por existirem, por serem uma fonte permanente de energia positiva e um pedido de desculpa pelas minhas ausências, por vezes incompreendidas, espero que esta etapa da minha/nossa vida seja um exemplo e inspiração para o vosso futuro.

E por último ao meu marido, o meu melhor AMIGO, o grande responsável por este sucesso, sem ele não teria conseguido, pelo seu apoio nos momentos de desespero, sempre com uma palavra amiga e com muita paciência, pela sua ajuda no tratamento estatístico, acima de tudo obrigado pelo seu carinho, amor e amizade nestes anos de felicidade.

A todos os que direta ou indiretamente me apoiaram o meu obrigado.

Resumo

O diagnóstico de doença hepática autoimune em doentes com patologia hepática implica a exclusão de outras causas de lesão hepática como vírica, alcoólica, tóxica, devido a alterações genéticas ou metabólicas, esteatose hepática não alcoólica e uma criteriosa avaliação de dados clínicos, bioquímicos, histológicos e colangiográficos específicas destas patologias (Invernizzi *et al* 2007)

O diagnóstico e tratamento precoces destas patologias são fundamentais para a prevenção da alta morbidade e mortalidade associada a estes doentes. O despiste de patologia hepática autoimune assenta na utilização de testes serológicos para a deteção de autoanticorpos associados a estas patologias. O conhecimento destes testes e a interpretação dos resultados obtidos revelam-se fundamentais para o diagnóstico ou exclusão destas doenças (Beuers 2005).

Deste modo, foi objetivo deste trabalho a pesquisa e identificação de autoanticorpos em uso clínico: ANA, AMA, AML, ANCA, Anti-SLA/LP, anti-LKM, anti-LC1 e anti-actina F, em doentes com suspeita de HAI e CBP em que foi excluída causa vírica, alcoólica e tóxica. O trabalho incidiu particularmente na comparação dos resultados do perfil de autoanticorpos de pedidos feitos ao exterior com os resultados obtidos recorrendo à utilização de um novo kit de imunoblot, e assim determinar a relevância da introdução da pesquisa dos novos autoanticorpos e avaliar a relação custo/benefício da implementação do kit BlueDot liver da D-tek[®] na rotina laboratorial do serviço de Patologia Clínica do Hospital Pedro Hispano.

Os resultados encontrados foram de 100% de concordância entre os métodos de imunofluorescência indireta e imunoblot, e Elisa e Imunoblot. Deste modo seria uma boa estratégia a implementação desta última técnica na rotina laboratorial uma vez que proporciona uma rápida disponibilização dos resultados para o clínico, antecipando desta forma o diagnóstico e o início rápido do tratamento em benefício do doente. Por outro lado, quando analisámos a relação custo/benefício, seria vantajosa a implementação desta técnica uma vez que o laboratório dispõe de capacidade técnica, e o custo de aquisição do kit não excede o valor praticado atualmente correspondendo a uma poupança de 51%.

Palavras-chave: Doença hepática autoimune, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, autoanticorpos, autoimunidade, fígado, ANA, AML, ANCA, anti-SLA/LP, anti-LKM, anti-LC1 e anti-actina F.

Abstract

Autoimmune liver diseases diagnosis requires the exclusion of other causes of liver injury, such as viral, alcoholic, toxic, genetic or metabolic. Also a careful evaluation of clinical symptoms, bioquimical markers and histology and cholangiografy data is needed.

Early diagnosis and tratement of these diseases are crucial in the prevention of their high morbidity and mortality.

Screening of autoimmune liver diseases relies on detection of specif autoantibodies. Result interpretation and careful selection of these tests are crucial in the exclusion of these diseases.

The aim arm of this study was to detect and identify several autoantibodies in clinical use, including ANA, AMA, SMA, ANCA, anti-SLA/LP, anti-LKM, anti-LC1 and anti F actinin in patients with suspected AIH and PBC in wich other liver disease had been previously excluded.

Antibody profiles processed in an external lab were compared with those of imunoblotting kit BlueDot liver D-Tek[®]. Relevance and implementation of the kit were assessed and implementation in the routine laboratory of Pedro Hispano Hospital was evaluated.

The results showed 100% agreement between the two methods. We think the implementation of this method in our laboratory routine would be beneficial as it provides a rapid availability of results leading to a faster diagnosis and treatment. Cost effectiveness is not a problem, as the kit cost does not exceed the cost of external processing, it would even result in a saving of 51%.

Keywords: autoimmune liver disease, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, autoantibodies, autoimmunity, liver, ANA, AML, ANCA, anti-SLA/LP, anti-LKM, anti-LC1 and anti-F actin.

Índice

Capítulo I: Introdução.....	1
1.1. A doença hepática autoimune.....	2
1.2. Hepatite autoimune.....	6
1.2.1. Etiologia e imunopatogenia.....	6
1.2.2. Manifestações clínicas.....	9
1.2.3. Diagnóstico de hepatite autoimune.....	10
1.2.3.1. Diagnóstico laboratorial.....	10
1.2.3.2. Diagnóstico histológico.....	12
1.2.3.3. Diagnóstico definitivo.....	13
1.2.3.4. Diagnóstico provável.....	14
1.2.4. Tipos de hepatite autoimune.....	18
1.2.5. Tratamento.....	20
1.2.6. Autoanticorpos na hepatite autoimune tipo 1.....	22
1.2.6.1. Anticorpos antinucleares (ANA).....	23
1.2.6.2. Anticorpos anti-músculo liso (AML).....	24
1.2.6.3. Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA).....	26
1.2.6.4. Anticorpos anti-antigénio hepático solúvel e anti-antigénio do fígado e pâncreas (SLA/LP).....	28
1.2.6.5. Autoanticorpos contra o recetor da asialoglicoproteína (anti-ASGP-R).....	29
1.2.7. Autoanticorpos na hepatite autoimune tipo 2.....	30
1.2.7.1. Anticorpos anti-microsossomais do fígado e rim (anti-LKM).....	30
1.2.7.2. Anticorpos anti-citosol hepático tipo 1 (anti-LC1).....	33
1.2.7.3. Autoanticorpos na hepatite autoimune na APECED.....	35
1.3. Cirrose Biliar primária.....	35
1.3.1. Marcadores Imunológicos na CBP.....	38
1.3.1.1. Anticorpos anti-mitocondriais.....	38
1.3.1.2. Anticorpos antinucleares.....	40
1.3.1.3. Outros autoanticorpos.....	43
1.4. Objetivo.....	45
Capítulo II: Material e métodos.....	47
2.1. População em estudo.....	48

2.2. Metodologia.....	48
2.2.1. Imunofluorescência indireta.....	49
2.2.1.1. Fator Antinuclear em células Hep-2.....	49
2.2.1.2. Técnica de IFI em tecido triplo de rato.....	50
2.2.2. Imunoensaio enzimático: ELISA.....	51
2.2.3. Imunoblot.....	52
2.3. Determinação de autoanticorpos.....	52
2.3.1. Anticorpos antinucleares.....	52
2.3.2. Anticorpos anti-mitochondriais.....	52
2.3.3. Anticorpos anti-músculo liso.....	53
2.3.4. Anticorpos anti-LKM.....	53
2.3.5. Anticorpos anti-SLA/LP e anti-LC1.....	54
2.3.6. Anticorpos anti-actina F.....	54
2.4. Análise estatística.....	55
Capítulo III: Resultados.....	57
3.1. Estudo bioquímico e serológico.....	59
3.2. Estudo imunológico (autoanticorpos).....	60
3.3. Comparação de métodos.....	67
3.4- Avaliação custo/benefício.....	70
Capítulo IV: Discussão e Conclusão.....	73
Capítulo V: Perspetivas futuras.....	77
Referências Bibliográficas.....	79

Índice de abreviaturas

2-OADC	2-oxoácido desidrogenase
ALT	alanina aminotransferase
AMA	anticorpos antimitocondriais
AML	anticorpos anti-músculo liso
ANA	anticorpos antinucleares
ANCA	anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos
APC	célula apresentadora de antigénio
APECED	distrofia ectodérmica autoimune com poliendocrinopatia e candidíase
APS1	síndrome poliglandular tipo 1
ASPG-R	recetor da asialoglicoproteína
AST	aspartato aminotransferase
BPI	bacterial permeability increasing factor
CAI	colangite autoimune
CBP	cirrose biliar primária
CCP	peptideo cíclico cítrulinado
CEP	colangite esclerosante primária
CMV	citomegalovírus
CREST	calcinose, Raynaud, atingimento esofágico, esclerodactília, telangiectasia
EBV	<i>Epstein-Bar</i> vírus
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ENA	anticorpos anti-antigénios nucleares extraíveis
FA	fosfatase alcalina
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GGT	gamaglutamiltransferase
Gp210	glicoproteína de 210 KDa associada ao poro nuclear
HAI	hepatite autoimune
Hep-2	linha celular epitelial humana tipo 2
HLA	antigénio leucocitário humano
IAIHG	International Autoimmune Hepatitis Group
IFI	imunofluorescência indireta
Ig	imunoglobulina

IL	interleucina
LC1	citosol hepático tipo 1
LES	lúpus eritematoso sistémico
LKM	microssomas do fígado e rim
LM	antigénio microssomal hepático
LP	antigénio do fígado e pâncreas
MPO	mieloperoxidase
NASH	esteatohepatite não alcoólica
NK	natural killer
P-ANCA	peripheral antineutrophil nuclear antibodies
PML	antigénio da leucemia promielocítica
PR3	proteinase 3
SLA/LP	antigénio hepático solúvel e antigénio do fígado e rim
SP100	proteína de 100 KDa associada aos poros nucleares
TC	linfócitos T citotóxicos
TH	linfócitos T helper
TG	anticorpos antitransglutaminase
UDCA	ácido ursodesoxicólico
VGT	vasos, glomerolos e túbulos
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C

Índice de tabelas

Tabela I- Doenças hepáticas autoimunes: dados clinicopatológicos.

Tabela II – Sistema de pontuação revisto do international Autoimmune Hepatitis Group.

Tabela III – Pontuação simplificada do Grupo Internacional da Hepatite Autoimune.

Tabela IV – Classificação dos subtipos de hepatite autoimune segundo os anticorpos presentes.

Tabela V- Antígenos mitocondriais e nucleares na CBP

Tabela VI – Dados bioquímicos e serológicos da população estudada.

Tabela VII – Percentagem de casos positivos por casos estudados.

Tabela VIII – Caracterização bioquímica e serológica dos três casos com pesquisa de anticorpos anti-actina F positiva.

Tabela IX – Sistema de pontuação simplificada do Grupo Internacional da HAI aplicada aos três casos de suspeita de HAI tipo 1.

Tabela X – Caracterização bioquímica e serológica dos três casos com pesquisa de anticorpos anti-mitocondriais M2.

Tabela XI – Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-mitocondriais M2 determinados pelas técnicas de ELISA (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Tabela XII - Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-LKM1 determinados pelas técnicas de IFI em tecido triplo de rato (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Tabela XIII - Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-LC1 determinados pelas técnicas de IFI em células HEP-2 (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Tabela XIV - Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-SLA determinados pelas técnicas de IFI em células HEP-2 (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Tabela XV - Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-actina F determinados pelas técnicas de ELISA (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Tabela XVI - Tabela representativa do valor/teste de cada autoanticorpo realizado na rotina laboratorial pelas técnicas atuais.

Tabela XVII - Tabela representativa do valor/teste do painel de autoanticorpos (anti-M2, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA e anti-actina F) determinados pela técnica em estudo.

Índice de figuras

Figura I – Ilustração dos hepatócitos e colangiócitos como alvos de agressão imunológica.

Figura II- Algoritmo para diagnóstico de doenças hepáticas de causa desconhecida.

Figura III- Ataque autoimune ao hepatócito.

Figura IV- Marcação de anticorpos antinucleares por técnica de IFI.

Figura V – Marcação de anticorpos anti-músculo liso por técnica de IFI.

Figura VI – Padrão de IFI dos anticorpos anti- actina em células HEP-2.

Figura VII – Representação de padrões de ANCA por técnica de IFI em neutrófilos humanos.

Figura VIII – Marcação de anticorpos anti-LKM1 por IFI

Figura IX – Imagens de anticorpos anti-LKM2 por IFI.

Figura X – Imagem de IFI sugestiva da presença de anticorpos anti-LM.

Figura XI – Imagem de IFI de um soro com anticorpos anti-LC1.

Figura XII- Imagens de IFI de anticorpos antimitocondriais.

Figura XIII- Imagem de IFI de padrão centrómero em células Hep2.

Figura XIV- Imagens de IFI de ANA em células Hep-2.

Figura XV-Estrutura das células Hep-2.

Figura XVI – Histograma de frequência das idades na população estudada.

Figura XVII – Histograma de frequência por sexo e idades na população estudada.

Figura XVII – Frequência dos vários autoanticorpos na população estudada.

Figura XVIII – Imagem dos imunoblots realizados às 31 amostras.

Capítulo I:

Introdução

1.Introdução

1.1. A doença hepática autoimune

O diagnóstico de doença hepática autoimune em doentes com patologia hepática implica a exclusão de outras causas de lesão hepática como vírica, alcoólica, tóxica, devido a alterações genéticas ou metabólicas, esteatose hepática não alcoólica e uma criteriosa avaliação de dados clínicos, bioquímicos, histológicos e colangiográficos específicas destas patologias (Invernizzi *et al* 2007).

As três principais categorias de doenças hepáticas autoimunes são a hepatite autoimune (HAI), a cirrose biliar primária (CBP) e a colangite esclerosante primária (CEP). Os alvos celulares de agressão imunológica nestas patologias são os hepatócitos e os colangiócitos (figura I) (Invernizzi *et al* 2007) e, conseqüentemente, a HAI é uma doença que afeta o parênquima hepático enquanto a CBP e a CEP atingem principalmente os canais biliares (McFarlane 2001).

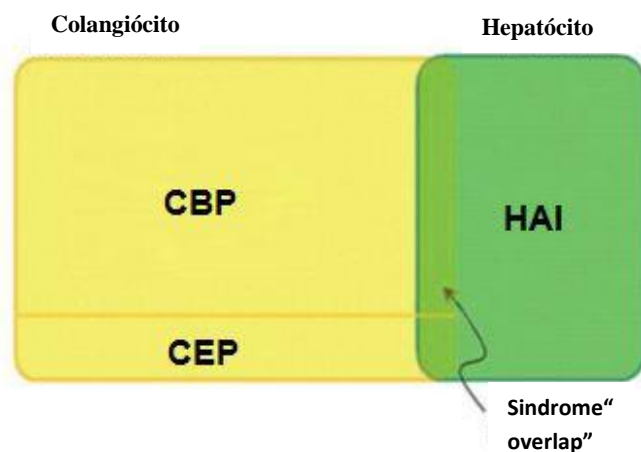


Figura I – Ilustração dos hepatócitos e colangiócitos como alvos de agressão imunológica. HAI- hepatite autoimune; CBP- cirrose biliar primária; CEP- colangite esclerosante primária. (Adaptado de Invernizzi *et al* (Invernizzi, Lio *et al* 2007).

Por vezes, os hepatócitos e os colangiócitos podem estar simultâneamente afetados o que levou à denominação de síndrome de “overlap” ou sobreposição (Invernizzi *et al* 2007).

O termo “colangite autoimune” foi proposto para um subgrupo de doentes com CBP sem anticorpos antimitocondriais (AMA) pelos métodos convencionais mas que exibem anticorpos antinucleares (ANA) de padrões específicos (múltiplos pontos nucleares e poros nucleares). Estudos mais recentes sugerem que estes doentes têm uma doença sobreponível com a CBP clássica (Invernizzi *et al* 2007).

Embora cada uma destas doenças tenha critérios clínicos, morfológicos e serológicos bem definidos, as formas atípicas e variantes, bem como as síndromes de sobreposição são cada vez mais frequentes (Washington 2007)

As doenças hepáticas autoimunes apresentam correlação com alguns marcadores de histocompatibilidade e, embora a componente hereditária tenha uma contribuição relativamente pequena para a manifestação da doença, há no entanto evidência de que vários genes podem constituir um risco acrescido para o desenvolvimento da doença, apesar da sua determinação não ser efectuada em estudos de rotina. A HAI relaciona-se principalmente com o haplotipo DR3 e DR4 e a CEP com o DR3 e o DR52. Embora tenham sido descritas várias associações de haplotipos HLA com a CBP, o mais frequente parece ser o DR8 (McFarlane 2001).

O diagnóstico de doenças hepáticas de causa desconhecida é por vezes difícil de realizar devido quer à existência de um quadro clínico pouco característico, quer à grande diversidade de autoanticorpos com diferentes especificidades apresentando por vezes sobreposições de padrões de imunofluorescência indireta (IFI), ou ainda à existência de um perfil serológico incomum deste tipo de patologias. No sentido de orientar o estudo serológico foi criado um algoritmo que é utilizado na rotina laboratorial para seleccionar melhor os testes a realizar no diagnóstico da HAI e CBP (figura II).

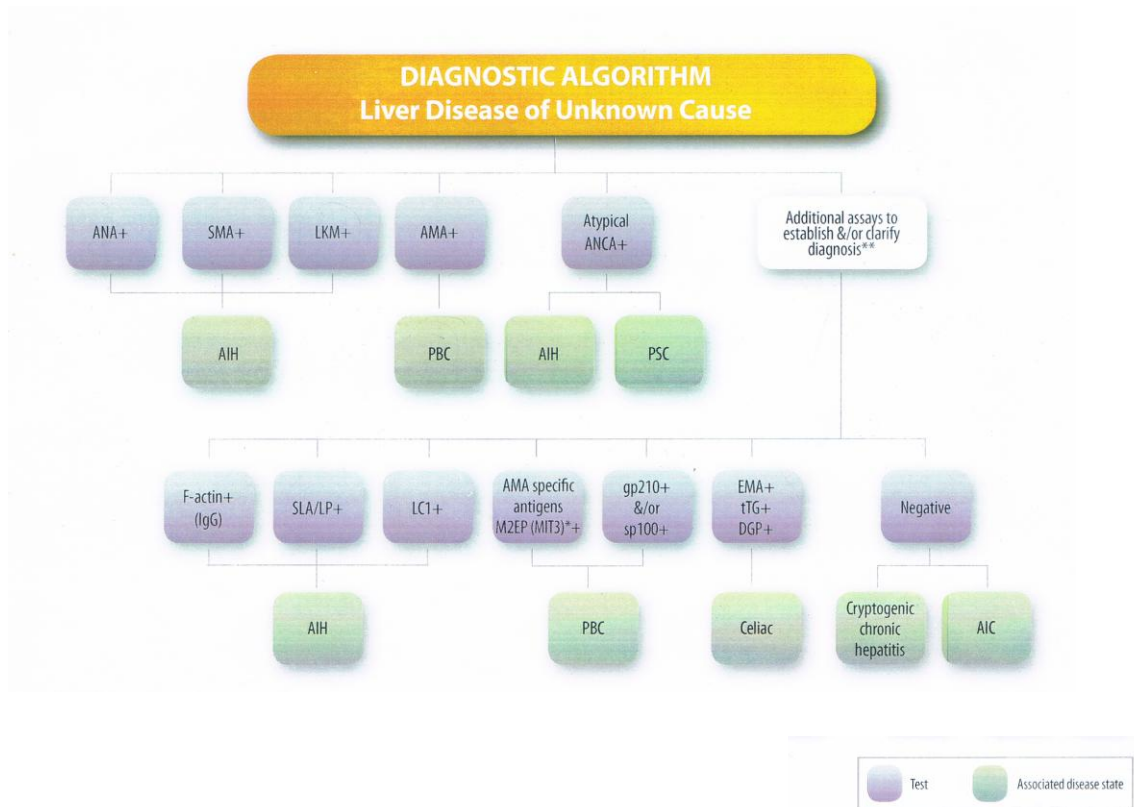


Figura II- Algoritmo para diagnóstico de doenças hepáticas de causa desconhecida. AIH, autoimune hepatitis (hepatite autoimune); AMA, anti-mitochondral antibodies (anticorpos anti-mitocondriais); ANA, anti-nuclear antibodies (anticorpos anti-nucleares); ANCA, anti neutrophil cytoplasmic antibodies (anticorpos anti- citoplasma dos neutrófilos); DGP, deamidated gliadin peptide (peptídeo gliadina desaminado); EMA, endomysium antibody (anticorpo endomísio); LKM, liver-kidney microsomal antibody (anticorpo microsomal fígado e rim); PBC, primary biliary cirrhosis (cirrose biliar primária); PSC, primary sclerotic cholangitis (colangite esclerosante primária); SLA, soluble liver antigen (antígeno solúvel hepático); SMA, smooth muscle antibody (anticorpo anti- músculo liso); tTG, tissue transglutaminase (tecido transglutaminase).

(Quanta Lite[®] da INOVA)

O diagnóstico e o tratamento precoces destas patologias são fundamentais para a prevenção da alta morbidade e mortalidade associada a estes doentes. O despiste de patologia hepática autoimune recai fortemente na utilização de testes serológicos para a detecção de autoanticorpos associados a estas patologias. O conhecimento destes testes e a interpretação dos resultados obtidos revelam-se fundamentais para o diagnóstico ou exclusão destas doenças (tabela I) (Beuers 2005).

Tabela I- Doenças hepáticas autoimunes: dados clinicopatológicos

	HAI	CBP	CEP	CAI
Feminino : masculino	4:1	9:1	1:2	9:1
Aumento das enzimas hepáticas	AST, ALT	FA, GGT	FA, GGT	FA, GGT
Aumento de Ig sérica	IgG	IgM	IgG, IgM	IgM
Autoanticorpos	ANA, AML, LKM1, SLA/LP, p-ANCA	AMA, AMA-M2, gp210	p-ANCA	ANA, AML
Associação HLA	A3, B8, DR3, DR4	DR8	DR52	B8, DR3, DR4
Histologia	Hepatite de interface e lobular; plasmócitos	Lesão tipo “florida”	Fibrose e obstrução dos grandescanais biliares	Lesão tipo florida
Diagnóstico	HAI pontuação > 15 para diagnóstico definitivo de HAI	AMA, padrão de enzimas colestásico; histologia compatível	Colangiografia compatível; padrão de enzimas colestásico, Cobre, p-ANCA	Padrão de enzimas colestásico, AMA neg., AMA ou ANA pos., histologia de CBP
Tratamento de 1ª linha	Imunossupressão (corticosteroides + azotioprina)	Ácido ursodesoxicólico (UDCA)	UDCA	UDCA

HAI, hepatite autoimune; CBP, cirrose biliar primária; CEP, colangite esclerosante primária; CAI, colangite autoimune; FA, fosfatase alcalina; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gamaglutamiltransferase; ANA, anticorpos anti-nucleares; AML, anticorpos anti-músculo liso; anticorpos anti-LKM1, anticorpos anti-microsomas do fígado e rim; AMA, anticorpos anti-mitocondriais; anti-SLA, anticorpos anti-antigénio hepático solúvel; glicoproteína de 210 Kda; p-ANCA, anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos; HLA, antigénio leucocitário humano.

Adaptado de Beures (Beuers 2005)

1.2. Hepatite autoimune

A HAI é uma doença inflamatória crónica, de carácter progressivo e de etiologia desconhecida, que se caracteriza pela presença de autoanticorpos circulantes, hipergamaglobulinemia, altos níveis de aminotransferases, alterações necro-inflamatórias na histologia hepática, e uma boa resposta à terapia imunossupressora. Esta patologia foi inicialmente referenciada por Amberg em 1942 (Amberg 1942) e Leber, em 1950 (Leber 1950), que descrevem uma forma de doença hepática crónica prevalente entre as mulheres jovens e caracterizada por um aumento excessivo de proteínas séricas e gamaglobulinas. Em 1951, Kunkel *et al.* denominou-a de hepatite crónica hipergamaglobulinémica (Kunkel *et al* 1951). Desde então, tem sido conhecida por vários nomes, incluindo hepatite crónica ativa, hepatite crónica agressiva, hepatite de células plasmáticas, e hepatite crónica ativa autoimune. Cowling e Mackay atribuíram o termo "hepatite lúpica" após terem observado a associação desta doença com síndromes autoimunes e o fenómeno das células LE (Mackay 1956). Em 1992, o International Autoimmune Hepatitis Group, recomendou a denominação de hepatite autoimune (Johnson e McFarlane 1993).

A doença é rara na população caucasiana dos países do Norte da Europa com uma incidência média de 1-2 por 100.000 e uma prevalência de 11-17 por 100.000 (Werner *et al* 2008). Embora mais frequente em mulheres jovens (proporção entre os sexos 3.6: 1), pode afetar crianças e adultos de todas as idades e etnias (Werner *et al* 2008; McFarlane *et al* 2008).

1.2.1. Etiologia e imunopatogenia

Embora a etiopatogenia exata seja desconhecida, pensa-se que a HAI, tal como muitas outras doenças autoimunes, seja causada por fatores ambientais e pela insuficiência de mecanismos de tolerância imunológica em indivíduos geneticamente suscetíveis. Uma série de agentes desencadeadores da resposta imune têm sido propostos, incluindo vírus, produtos químicos ou fármacos, que em indivíduos geneticamente predispostos induziriam a perda de tolerância a antígenos hepatocelulares levando a um ataque autoimune e resultando numa inflamação crónica progressiva, mas ainda não foi comprovado o

envolvimento de qualquer um deles na patogénese da doença. Desta forma a HAI é ainda uma doença de causa desconhecida e com diversas manifestações clínicas (Crawitt 2006).

Em relação aos fármacos, vários medicamentos têm também sido implicados como agentes capazes de desencadear HAI, tais como: Infliximab, Minociclina, atorvastatina, diclofenac, isoniazida, α -metildopa, nitrofurantoína, propiltiouracil e a vacina para a Hepatite A. Certas ervas, como “cohosh” preto e “dai-Saiko-to” também têm sido propostas como sendo capazes de induzir a HAI. Tal como já foi referido anteriormente, o verdadeiro mecanismo pelo qual as drogas induzem a HAI não é conhecido, mas pode ser explicado pelo efeito hepatotóxico destes produtos químicos, causando sobreexpressão de proteínas (P450s, proteínas imunorreguladoras) ou relacionados com o fato de a droga agir como um hapteno, modificando a proteína hepática tornando-a imunogénica. Os vírus como os da hepatite A, B, ou C, juntamente com os do sarampo têm sido implicados como indutores de HAI. Doentes com diagnóstico de hepatite alcoólica aguda ou crónica, hepatite não-alcoólica e hepatite virica podem aparecer com autoanticorpos ANA e anti-músculo liso (AML) em baixo título. Nestes casos, a presença de autoanticorpos não deve alterar o diagnóstico. Se existir uma forte suspeita de HAI, complementa-se o estudo autoimune com a pesquisa de anticorpos anti-actina F, aumentando desta forma a especificidade do teste AML para o diagnóstico da HAI (Aubert *et al* 2008). Os anticorpos anti-microsomas do fígado e rim tipo 1 (LKM-1) são encontrados em cerca de 10% dos doentes com hepatite C crónica e são diferentes dos anti-LKM-1 encontrados em hepatite autoimune clássica (Cassani *et al* 1997).

As infeções viricas podem assim criar um ambiente permissivo pró-inflamatório que constitui um factor crítico para o desenvolvimento da doença autoimune, perpetuando o aparecimento de reações autoimunes.

O mimetismo molecular entre antigénios exógenos e endógenos pode explicar a perda da auto-tolerância e a auto-imunidade em órgãos anatomicamente distantes. A HAI é caracterizada por uma perda de tolerância imunológica de antigénios dos hepatócitos levando à destruição do parênquima hepático por células T auto-reativas (Vergani *et al* 2003; Orts Costa 2004). A existência de mimetismo molecular ao nível das células B entre um motivo estrutural da CYP2D6 e Proteínas do vírus da hepatite C (VHC) pode explicar a produção de anticorpos anti-LKM-1 em doentes infectados com VHC (Kammer *et al* 1999).

Atualmente, prevalecem duas teorias: a da hepatotoxicidade mediada por células dependentes de autoantígenos e a da hepatotoxicidade mediada por células dependentes de autoanticorpos (Vaio 2008). No primeiro caso, autoantígenos ou antígenos estranhos, semelhantes aos autoantígenos, são apresentados por moléculas da classe II do sistema de histocompatibilidade em células apresentadoras de antígeno (APC) levando à ativação de células T CD4+. Por sua vez estas vão produzir IL-2 e IFN- γ o que leva à ativação dos macrófagos e linfócitos T citotóxicos que são responsáveis pela hepatotoxicidade. Na segunda hipótese, os linfócitos T CD4+ libertam IL-4, IL-5 e IL-10 que induzem a produção de anticorpos pelos linfócitos B contra antígenos presentes na membrana do hepatócito, devido a um defeito da função supressora (McFarlane 1999; Czaja 2005; Vaio 2008; Vergani e Miel-Vergani 2008) (figura III). Estas hipóteses não são mutuamente exclusivas, podendo ambas estar presentes em diferentes fases da doença.

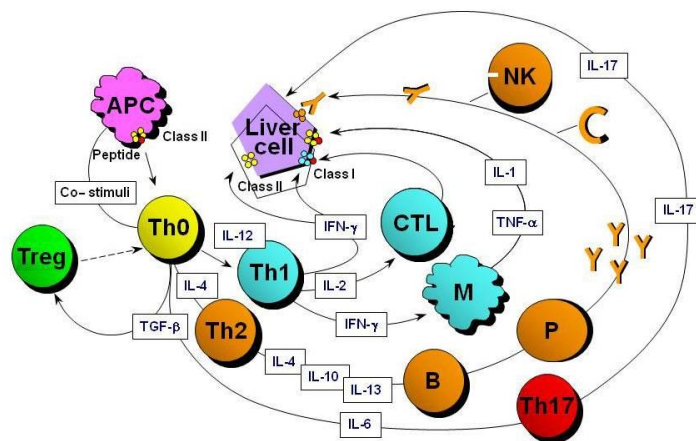


Figura III- Ataque autoimune ao hepatócito. Um peptídeo autoantigénico específico é apresentado ao linfócito T helper “virgem” (Th0) pela molécula HLA II da célula apresentadora do antígeno (APC). As células Th0 ativadas, conforme a presença no microambiente de IL-12 ou IL-4 e a natureza do antígeno, diferenciam-se em Th1 ou Th2 e inicia-se uma série de reações imunes determinada pelas citocinas que produzem. As células Th2 secretam maioritariamente IL-4, IL-10 e IL-13 e estimulam os linfócitos B à produção de autoanticorpos. As células Th1 secretam IL-2 e IFN- γ , que estimula os linfócitos T citotóxicos (Tc) estimulando a expressão das moléculas HLA da classe I e II nos hepatócitos e ativando os macrófagos; os macrófagos ativados libertam IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Se não houver oposição das células T reguladoras, são desencadeados vários mecanismos: destruição dos hepatócitos pelos linfócitos T citotóxicos; recrutamento de macrófagos pelas citocinas libertadas pelas células Th1; ativação do complemento ou ativação através do recetor do fragmento Fc, em células como os linfócitos T “naturalkiller” (NK), pelos autoanticorpos ligados à superfície do hepatócito. O papel recentemente descrito das Th17 encontra-se em investigação. Adaptada de Vergani e Mieli-Vergani (Vergani e Mieli-Vergani 2008)

1.2.2. Manifestações clínicas

As mulheres constituem pelo menos 70% dos casos, e destas, 50% têm idade inferior a 40 anos. No entanto, a idade do aparecimento da doença pode variar desde a infância até à terceira idade. A HAI tem diversas apresentações: 25-34% dos doentes apresentam-se assintomáticos mas com alteração da função hepática, 40% dos doentes podem apresentar um início agudo da doença, sendo raro o aparecimento de hepatite fulminante severa (Manns *et al.* 2010). A cirrose é mais comum em crianças ou idosos, apresentando sintomas que podem incluir fadiga, letargia, mal-estar, artralgia das pequenas articulações, anorexia, náuseas, dor abdominal e colúria. Estes sintomas são inespecíficos e contribuem para o atraso no diagnóstico.

O exame físico pode ser normal ou pode revelar hepatomegalia, esplenomegalia, icterícia e estigmas de doença hepática crónica. No caso das mulheres jovens, estas apresentam raramente acne, hirsutismo, obesidade e amenorreia. Outras doenças auto-imunes como a tireoidite de Hashimoto, diabetes tipo 1, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico, doença de Crohn ou colite ulcerosa e doença celíaca podem ocorrer em 20% dos doentes com HAI (Chowdhary *et al* 2008). Chung *et al.* descreveu um novo subtipo de HAI caracterizada por um infiltrado de células plasmáticas de imunoglobulinas G4 (IgG4) positivas (Chung *et al* 2010). Este subtipo de HAI está associado a níveis séricos de imunoglobulinas G (IgG) elevados, a uma HAI severa, e a uma excelente resposta à terapia com prednisona para indução e manutenção da remissão. A coloração IgG4 positiva é sugerida pelos autores como um marcador para o subtipo de HAI que pode responder bem à corticoterapia.

1.2.3. Diagnóstico de hepatite autoimune

O diagnóstico de HAI exige a presença de características bioquímicas (hipergamaglobulinémia marcada com elevação seletiva de IgG e/ou discreta ou moderada elevação dos níveis de aminotransferases) e exclusão de outras condições crônicas do fígado, tais como a hepatite vírica, hepatite induzida por drogas, esteatose hepática, doença hepática alcoólica, doença de Wilson, déficit de alfa 1 antitripsina ou hemocromatose.

1.2.3.1. Diagnóstico laboratorial

O perfil bioquímico típico na HAI é similar ao de uma hepatite aguda, com aumento da atividade das transaminases, aumento da concentração da bilirrubina e com uma fosfatase alcalina normal ou ligeiramente aumentada. Na CBP e na CEP a situação é inversa: a fosfatase alcalina está aumentada e a atividade das transaminases e a concentração da bilirrubina estão normais ou ligeiramente aumentadas.

A HAI caracteriza-se pelo aumento das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) com níveis <500 U / L, raramente podendo variar entre 500 – 1000 U / L.

Outra característica laboratorial da HAI é a hiperglobulinemia, que é devida, geralmente, a um aumento seletivo da IgG, 1,2-3,0 vezes superior ao valor normal (Czaja 1999) e a uma IgM normal ou ligeiramente aumentada, enquanto na CBP se deve principalmente a um aumento da IgM. Na CEP, observa-se frequentemente um aumento da IgG e da IgM. Habitualmente, os níveis de IgA são normais nas três patologias (McFarlane 2001), com exceção da HAI tipo 2 em que é comum uma deficiência seletiva de IgA (até 45% dos casos) (Vergani e Mieli-Vergani 2003)

Na HAI tipo 1 os doentes apresentam níveis serológicos de enzimas hepáticas AST e ALT elevados, embora inferiores aos encontrados no tipo 2 e níveis de IgG altos, IgA normais e C4 baixos. A HAI tipo 1 é também caracterizada pela presença de ANA, AML ou ambos, e constitui 80% dos casos HAI, destes cerca de 25% têm cirrose na sua

apresentação e é comum a associação com outras doenças auto-imunes (doença celíaca, colite ulcerosa e doença autoimune da tiróide) (Manns *et al* 2009; Vergani *et al* 2009).

Na HAI Tipo 2 para além dos altos níveis de transaminases, a concentração de bilirrubinas também está elevada, apresenta níveis mais baixos de gamaglobulinas comparativamente ao tipo 1, e os níveis de IgA e C4 apresentam-se baixos. É caracterizada pela presença de anti-LKM1 e/ou anti-LKM3 e/ou anti-citosol hepático tipo 1 (LC1) (Homberg *et al* 1987; Martini *et al* 1988). Este tipo de hepatite tem uma apresentação aguda grave, e progride para cirrose (Alvarez *et al* 1990). Em doentes com resultados negativos para anticorpos convencionais e em que há uma forte suspeita de HAI, podem ser feitos testes adicionais incluindo os ANCA, anti-actina F, anti-antigénio solúvel hepático (SLA), receptor asialoglicoproteína (anti-ASGP-R), cromatina, e anti-LC1.

A HAI tipo2 é muito menos frequente que a tipo1, numa relação de 8:2 (Lenzi *et al* 1992; Jurado *et al* 1997)

Alguns doentes apresentam alta concentração de bilirrubina conjugada e fosfatase alcalina (FA), sendo necessário excluir a obstrução biliar extra-hepática, forma colestática de hepatite vírica, doença hepática induzida por drogas, CBP e CEP. A FA raramente ultrapassa quatro vezes o valor normal e geralmente permanece duas vezes superior ao normal. Os níveis séricos de alfa-1 antitripsina, ceruloplasmina e cobre são geralmente normais na HAI, mas o valor do C4 é frequentemente baixo (Orts Costa 2004).

Note-se que a tipagem antigénio leucocitário humano (HLA) não foi aprovada como uma ferramenta de diagnóstico ou prognóstico.

O diagnóstico de HAI estabelece-se após a exclusão de outras causas mais prevalentes de doença hepática. A HAI caracteriza-se pela presença de anticorpos séricos contra componentes nucleares, citoplasmáticos e microssomais do hepatócito, hipergamaglobulinemia com elevação predominante da fração G da imunoglobulina, e a presença de hepatite periportal ao exame histopatológico (Grendell *et al* 1996).

1.2.3.2. Diagnóstico histológico

De acordo com os dados disponíveis na literatura, a avaliação histológica do fígado é necessária para estabelecer o diagnóstico e a gravidade da doença, além de determinar a necessidade do tratamento. Entretanto, atualmente a indicação de biópsia hepática pré-tratamento nos casos que preencham critérios clínicos e laboratoriais de hepatite autoimune é questionada (Czaja *et al* 1996).

Embora a aparência histopatológica da HAI seja característica, a mesma não é específica desta doença. Características semelhantes podem ser vistas nas hepatites crônicas virais, hepatite crônica por drogas, outras hepáticas autoimunes, deficiência de alfa-1 antitripsina, doença de Wilson, hepatite granulomatosa, esteatohepatite alcoólica e não-alcoólica (Krawitt e Eduard L. 1996).

A principal característica histológica da HAI é um infiltrado periportal linfoplasmocitário invadindo a placa limitante, também chamada de necrose parcelar ou hepatite de interface, que eventualmente progride para hepatite lobular. Os achados histológicos caracterizam-se por uma abundância de células plasmáticas e os eosinófilos encontram-se frequentemente presentes. A lesão portal típica não se estende à árvore biliar e é também frequentemente observada uma hepatite lobular ou panacinar. A fibrose está presente em todas as formas de HAI e provoca distorção do lóbulo hepático e o aparecimento de nódulos regenerativos, resultando em cirrose (Feld *et al* 2005). Muitos doentes com um quadro agudo podem apresentar na biópsia hepática critérios de cronicidade indicando uma fase subclínica da doença e vários pacientes com quadros clínicos leves da doença podem apresentar fibrose avançada na biópsia. Um aspeto importante é o facto da fibrose e até a cirrose hepática em HAI ser reversível num grau significativo recorrendo à terapia com imunossupressores o que não acontece noutras doenças crônicas do fígado.

A presença destes padrões histológicos em conjunto tem alta especificidade e alto valor preditivo positivo para a HAI, embora a sensibilidade dos mesmos seja baixa. Desta forma, a ausência das características histológicas descritas de HAI não exclui o diagnóstico (Cançado *et al* 2004).

A maioria dos pacientes com HAI apresenta cirrose na biópsia inicial. As principais indicações da biópsia hepática na HAI são a dúvida diagnóstica, quando o quadro clínico é atípico, e para o controlo da resposta ao tratamento. A maioria dos autores, preconiza a realização de biópsia hepática pré-tratamento mesmo nos casos clássicos, para estadiamento, embora atualmente esta conduta seja discutível.

1.2.3.3. Diagnóstico definitivo

São critérios para diagnóstico definitivo de HAI (Grendell *et al* 1996):

- Ausência de doença hepática genética, com alfa-1 antitripsina, ceruloplasma, ferro e ferritina séricos normais.
- Ausência de marcadores de infecção virica ativa, incluindo marcadores para hepatite virica A, B e C, citomegalovírus (CMV) e vírus Epstein Barr (EBV).
- Ausência de outros fatores etiológicos como uso abusivo de álcool e drogas narcóticas; Ingestão diária de álcool inferior a 25g/dia.
- Presença de ANA, AML ou anticorpos anti-LKM-1, em título maior ou igual 1/80.
- Globulina sérica total, imunoglobulina G ou gamaglobulina em nível sérico maior que 1,5 vezes o valor superior da normalidade.
- Aumento predominante de aminotransferases.
- Hepatite de interface na histologia hepática.
- Ausência de doença biliar, granuloma, siderose, depósito de cobre ou outros achados histológicos sugestivos de outras causas.

1.2.3.4. Diagnóstico provável

São critérios para diagnóstico provável de HAI (Grendell *et al* 1996):

- Aumento do nível sérico de imunoglobulina em qualquer nível.
- Presença de autoanticorpos em título maior ou igual 1/40.
- Presença de outros autoanticorpos não relacionados à doença hepática.
- Passado de exposição já interrompida a álcool ou drogas hepatotóxicas, que não justifiquem perpetuação de atividade inflamatória.
- Alterações limítrofes da dosagem de alfa-1 antitripsina, ceruloplasmina, ferro e ferritina séricos.
- Ausência de marcadores víricos para hepatite A, B e C.
- Hepatite de interface na histologia hepática.
- Ausência de doença biliar, granuloma, siderose, depósito de cobre ou outros achados histológicos sugestivos de outras causas.

Em 1992 o grupo internacional para estudo da HAI reuniu-se e estabeleceu pela primeira vez o sistema de pontuação para o diagnóstico da HAI. Os critérios de diagnóstico, baseados num consenso do International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG), datado de 1992 (Johnson e McFarlane 1993) e revisto em 1999 (Alvarez *et al* 1999), têm em consideração critérios clínicos, epidemiológicos, bioquímicos e histológicos, estabelecendo uma pontuação que classifica o diagnóstico em provável ou definitivo (tabela II) (Czaja 2008). São adicionados pontos nos parâmetros considerados típicos de HAI e subtraídos pontos naqueles que são associados a outras doenças crônicas.

Tabela II – Sistema de pontuação revisto do international Autoimmune Hepatitis Group.

Parâmetro	Resultado	Pontos	Parâmetro	Resultado	Pontos
Sexo	Feminino	+2	HLA	DR3 ou DR4	+1
Índice FA/AST (ou ALT)	>3	-2			
	<1,5	+2			
Gamaglobulinas ou IgG aumentada	>2,0	+3	Doenças imunes	Tiroidite, colite, outras	+2
	1,5 – 2,0	+2	Outros marcadores		
	1,0 – 1,5	+1		Anti-SLA, actina, LC1, p-ANCA	+2
	<1,0	0			
Títulos de ANA, AML ou Anti-LKM1	>1:80	+3	Histologia	Hepatite de interfase	+3
	1:80	+2		Plasmócitos	+1
	1:40	+1		Rosetas	+1
	<1:40	0		Nenhum dos anteriores	-5
AMA	Positivo	-4		Alterações biliares outros	-3 +3
Marcadores víricos	Positivo	-3			
	Negativo	+3			
Drogas	Sim	-4	Resposta ao tratamento	Completo	+2
	Não	+1		Recaída	+3
Álcool	<25g/dia	+2			
	>60g/dia	-2			

Pontuação pré-tratamento: diagnóstico definitivo > 15; diagnóstico provável 10-15

Abreviaturas: FA, fosfatase alcalina; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; ANA, anticorpos anti-nucleares; AML, anticorpos anti-músculo liso; anticorpos anti-LKM1, anticorpos antimicrosomas do fígado e rim; AMA, anticorpos anti-mitocondriais; anti-SLA, anticorpos anti-antigénio hepático solúvel; anti-LC1, anticorpos anti-citosol hepático tipo 1; p-ANCA, anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos; HLA, antigénio leucocitário humano.

Adaptado de Czaja (Czaja 2008)

Este sistema de pontuação permite uma classificação uniforme de vários grupos de doentes, avaliando 10 parâmetros: sexo, razão FA/ALT, elevação das globulinas séricas ou da IgG, a presença ou ausência de ANA, AML ou anti-LKM1, a presença ou ausência de AMA, a presença ou ausência de marcadores de hepatites víricas, história de drogas ilícitas ou abuso de álcool, dados histológicos, e a presença de outras patologias autoimunes (Papamichalis *et al* 2007).

Este sistema de pontuação, descrito inicialmente como uma ajuda na seleção de grupos de doentes com critérios clínico-patológicos idênticos para fins de investigação, provou a sua utilidade na prática clínica, especialmente para doentes atípicos e nalguns casos de síndromes de sobreposição (Orts Costa 2004; Czaja 2005). Embora útil para o diagnóstico inicial e como guia para instituir a terapêutica adequada, não fornece informação adicional sobre a gravidade da doença e o seu prognóstico (Orts Costa 2004).

A principal limitação deste sistema é a sua complexidade, o que o torna de difícil aplicação na clínica (Czaja 2008). Com o objetivo de resolver estas dificuldades Hemes e colaboradores, desenvolveram um sistema simplificado baseado em apenas quatro parâmetros, nomeadamente, a histologia hepática, o título de autoanticorpos, os níveis de IgG e a ausência de marcadores de hepatites víricas (Choi e Peters 2008; Czaja 2008; Hennes *et al* 2008) (tabela III).

Tabela III – Pontuação simplificada do Grupo Internacional da Hepatite Autoimune.

Parâmetro	Resultado	Pontos
Autoanticorpos		
ANA ou AML	≥1:40	+1
ANA ou AML	≥1:80	+2
Anticorpos anti-LKM1	≥1:40	+2
Anticorpos anti-SLA/LP	Positivo	+2
Ausência de autoanticorpos	Negativo	0
Níveis de imunoglobulinas		
Imunoglobulina G	>Limite superior normal	+1
	>1.10 limite superior normal	+2
	Normal	0
Dados histológicos		
Morfologia compatível com HAI	Compatível	+1
	Típica	+2
	Normal	0
Doença vírica		
Ausência de hepatite vírica	Nenhum marcador vírico	+2
	Presença de marcadores víricos	0
Pontuação pré-tratamento		
	Diagnóstico provável	≥6
	Diagnóstico definitivo	≥7

O máximo de pontos obtido com todos os autoanticorpos é dois.

Adaptado de Czaja (Czaja 2008)

Este sistema de classificação, atribui um ponto para títulos de ANA ou AML superiores ou igual a 1:40 e para valores de IgG superiores ao limite superior do normal; atribui dois pontos para títulos de ANA ou AML superiores ou iguais a 1:80, títulos de LKM superiores ou igual a 1:40, presença de anticorpos anti-SLA/LP, ou IgG superior a 1,1 vezes o valor superior normal. O valor máximo de pontos para o conjunto dos autoanticorpos é de dois e o total de pontuação é oito (Choi e Peters 2008; Czaja 2008; Hennes *et al* 2008).

Para este tipo de classificação, o título dos ANA corresponde à determinação por IFI em tecido triplo de rato. Quando são usadas linhas celulares epitelial humana tipo 2 (células Hep-2) o título deve ser superior (Hennes *et al* 2008).

Este novo sistema condensa a histologia hepática em três categorias: típica, compatível e atípica. A típica inclui hepatite de interfase, infiltrados linfócitos/linfoplasmocitários no trato portal, estendendo-se pelo lobulo, “emperipolesis” e formação de rosetas. Compatível quando se observa apenas hepatite crônica com infiltrado linfocítico, e atípica quando evidência outro diagnóstico (Choi e Peters 2008).

Estudos recentes, concluíram que os sistemas não são intermutáveis: o sistema IAIHG apresenta uma alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico e que a pontuação simplificada tem uma especificidade e um valor preditivo superior (Czaja 2008).

1.2.4. Tipos de hepatite autoimune

A presença de autoanticorpos contra diversos antígenos no soro de doentes com hepatite não só permite diagnosticar uma HAI como permite classificá-la em três tipos que dependem dos perfis de autoanticorpos séricos.

Em 1994, foram propostos três tipos de HAI, de acordo com o padrão de autoanticorpos detetado (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004). A HAI tipo 1 afeta principalmente mulheres e tem uma maior incidência entre os 20 e os 40 anos, é caracterizada pela presença de AML e/ou ANA. Os autoanticorpos anti-citoplasma dos

neutrófilos (p-ANCA) embora não específicos também podem estar presentes neste tipo de hepatite (60-90%) (Washington 2007).

A HAI tipo 2 (HAI-2) afeta mais as crianças e, tal como a HAI tipo 1, atinge sobretudo o sexo feminino, e é caracterizada pela deteção de autoanticorpos específicos anti-LKM1, ou mais raramente tipo 3 e/ou anti-LC1.

A HAI tipo 3 era caracterizada pela presença de autoanticorpos anti-SLA, liver ou anti-antígeno do fígado e pâncreas (anti-LP, liver pancreas antigen). No entanto, estudos recentes mostraram que a positividade para o anti-SLA não define um subtipo diferente de HAI, passando este subtipo a ser incluído na HAI tipo 1 (Orts Costa 2004). Por esta razão, atualmente utiliza-se a subdivisão em dois grupos: HAI tipo 1 (ANA, AML, p-ANCA, anti SLA/LP) e HAI tipo 2 (anti-LKM1, anti-LKM3, anti-LC1) (tabela IV) (Dalekos *et al* 2002).

Além dos diferentes marcadores imunológicos, a HAI tipo 2 parece ser clínica e geneticamente diferente da HAI tipo 1. A HAI tipo 2 tem geralmente uma apresentação mais precoce, apresentando níveis mais elevados de bilirrubinas e transaminases (AST e ALT), cursando com mais gravidade do que a HAI tipo 1 (Dalekos *et al.* 2002; Zachou *et al* 2004).

Tabela IV – Classificação dos subtipos de hepatite autoimune segundo os anticorpos presentes

Tipo de HAI	Autoanticorpos característicos
HAI-1	ANA, AML, p-ANCA, anti-SLA/LP, anti-ASGP-R
HAI-2	anti-LKM1, anti-LC1, anti-ASGP-R

Adaptado de Dalekos (Dalekos, Zachou *et al* 2002)

Foi descrita uma forma rara de HAI em doentes com uma doença autossômica recessiva, a distrofia ectodérmica autoimune com poliendocrinopatia e candidíase (APECED) também denominada Síndrome Poliglandular Autoimune tipo 1 (APS-1). Esta é uma doença rara, sem associação HLA-DR e sem prevalência no sexo feminino (Czaja 2005). Usualmente apresenta-se na primeira década de vida e caracteriza-se por distrofia da ectoderme, candidíase mucocutânea e falência de múltiplos órgãos endócrinos (paratiróide, adrenal, ovários), mediada por mecanismos imunológicos (Czaja e Freese 2002). Aproximadamente 10% a 20% destes doentes apresentam uma hepatite crónica. Contrariamente ao que se verifica com outras doenças autoimunes, a APECED está associada a uma mutação de um único gene, denominado AIRE (autoimune regulator), localizado no cromossoma 21q22.3. Esta mutação pode alterar a deleção tímica das células T autoreativas (Czaja e Norman 2003). Os doentes com APECED e HAI têm uma doença hepática particularmente agressiva que não responde bem aos esquemas de tratamento com imunossuppressores (Czaja e Freese 2002).

1.2.5.Tratamento

A HAI é uma doença hepática crónica tratável na maioria dos casos, raramente entrando em remissão espontânea e evoluindo frequentemente para cirrose hepática. Os doentes não tratados com inflamação histológica ativa têm pior sobrevida. Desta forma, o seu tratamento tem como finalidade a tentativa de impedir ou retardar a sua progressão para formas mais graves da doença (Cançado *et al* 2004).

A HAI habitualmente responde ao tratamento imunossupressor e foi a primeira doença hepática crónica em que a terapêutica aumentou a sobrevida dos pacientes (Manns e Vogel 2006).

O tratamento inicial e de manutenção mais utilizado na HAI é a corticoterapia isolada ou em associação com a azatioprina. A maioria dos doentes necessita de um tratamento de manutenção por tempo prolongado, e geralmente a resposta é melhor quando a doença não é muito agressiva.

Os adultos com cirrose na biopsia inicial e as crianças, particularmente as que apresentam o tipo 2 da doença, raramente permanecem em remissão quando o tratamento é retirado e geralmente necessitam de tratamento vitalício.

A presença histológica de necrose em ponte ou multilobular está associada à progressão para cirrose em 82% e uma mortalidade a 5 anos de 45% para doentes não tratados (Feld *et al* 2005). Em doentes assintomáticos com cirrose inativa (definida como ausência ou inflamação limitada), a terapia com corticóides não demonstrou melhoria na sobrevivência. Os doentes sem cirrose que se submetem a um tratamento têm uma probabilidade de sobrevida de 10 a 20 anos superior a 80%, semelhante à população em geral (Feld *et al* 2005).

A análise retrospectiva de doentes com doença leve tem demonstrado a possibilidade de sobrevivência a longo prazo sem tratamento, mas é necessário um acompanhamento cuidadoso. Doentes não tratados raramente recuperam espontaneamente, a melhoria é menos comum e a sobrevida a longo prazo é menor do que em doentes tratados (Czaja *et al* 2009). A HAI é uma doença com uma atividade imprevisível e variável, e a maioria dos doentes deve submeter-se a terapia. As indicações para o tratamento são baseadas na presença e gravidade da inflamação hepática e também na presença de fatores de risco para a progressão da doença como o aumento sérico das concentrações das enzimas hepáticas, sintomas incapacitantes, presença histológica de hepatite de interface, pontos de necrose ou colapso multiacinar, que prevêm um pior prognóstico sem tratamento.

Têm sido efetuados poucos progressos em tratamentos alternativos para doentes com resposta inadequada ou com intolerância ao tratamento com corticosteroides isolados ou em associação com azatioprina. Outros fármacos incluem o micofenolato de mofetil, o metotrexato, a ciclosporina, o tacrolimus, o budesonide, e o ácido ursodesoxicólico (UDCA) (Krawitt 2008).

Para aproximadamente 10% dos casos de doentes com HAI, o transplante hepático é a única opção que permite a sobrevida do doente. Geralmente são candidatos a transplante hepático aqueles que não respondem ao tratamento nos primeiros seis meses ou os que não atingem a remissão após três anos consecutivos de tratamento (Manns e Vogel 2006). A HAI pode reaparecer após transplante hepático ou aparecer “de novo” em

indivíduos transplantados por doenças não autoimunes, podendo afetar todas as idades ou etnias (Czaja 2008).

1.2.6. Autoanticorpos na hepatite autoimune tipo 1

A pesquisa de autoanticorpos nas doenças hepáticas tem por principal objetivo o diagnóstico das doenças hepáticas autoimunes, podendo, adicionalmente ser uma ferramenta útil para monitorizar a atividade da doença (Mans e Vogel 2006). A ausência de standardização da serologia hepática é responsável pela baixa sensibilidade e especificidade de alguns destes testes (Mans e Vogel 2006). O IAIHG criou um comité internacional para desenvolver procedimentos e métodos de referência para testes mais fidedignos (Vergani e col. 2004). A pesquisa de ANA, AML e LKM é fundamental para o diagnóstico de HAI, devendo constituir os testes de primeira linha em doentes com suspeita de HAI. Os anticorpos contra LC-1, SLA/LP, p-ANCA e anti-recetor da asialoglicoproteína (anti-ASGP-R) podem ser úteis para o diagnóstico de HAI em doentes seronegativos para os testes de primeira linha.

Os anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) são anticorpos altamente associados à artrite reumatóide e são encontrados em aproximadamente 9% de doente com HAI (Czaja 2007). Estes doentes têm maior ocorrência de cirrose, morrendo mais frequentemente de falência hepática, podendo, por isso, considerar-se marcadores de fibrose hepática avançada (Czaja 2007).

Czaja defende a realização de testes de rastreio da doença celíaca em doentes com HAI e em doentes com doença hepática crónica indiferenciada, uma vez que a doença celíaca pode ocorrer concomitantemente com a HAI ou pode causar disfunção hepática que melhora com restrição de glúten (Czaja 2005).

1.2.6.1. Anticorpos antinucleares (ANA)

Os anticorpos antinucleares foram os primeiros autoanticorpos a serem associados à HAI, sendo responsáveis pela designação de hepatite "lupóide", por Mackay em 1956 (Means e Vogel 2006). Os ANA são um marcador inespecífico de HAI, podendo ser encontrados na CBP, nas hepatites virícas e nas esteatohepatites não alcoólicas. A sua prevalência na população saudável, principalmente na população mais idosa, atinge os 15% (Manns e Vogel 2006).

Nos casos mais típicos de HAI tipo 1, estes autoanticorpos, em associação com os AML, são detetados em títulos significativos ($\geq 1:80$ nos adultos e $\geq 1:40$ nas crianças) em aproximadamente metade dos doentes caucasianos com HAI-1, enquanto os ANA isolados são detetados em apenas 15% e os AML isolados em 35% (Dalekos e col. 2002; Zachou e col. 2004). O método mais utilizado para a pesquisa dos ANA é a IFI em células HEP-2 ou em cortes de tecido de rato.

Os antígenos alvos são heterogêneos e não estão completamente definidos: DNA (cadeia simples ou dupla), cromatina, ribonucleoproteínas, lamininas A e C, ciclina A e histonas (Dalekos *et al* 2002; Orts Costa 2004; Zachou *et al* 2004; Bogdanos *et al* 2008).

Podem ser observados diferentes padrões de fluorescência devido à diversidade de antígenos alvo nas células HEP-2. Os padrões mais frequentes são o homogêneo (34-58%) ou o mosqueado (21-34%) (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004), podendo observar-se outros padrões como o nuclear e a associação dos padrões nuclear e mosqueado (figura IV).

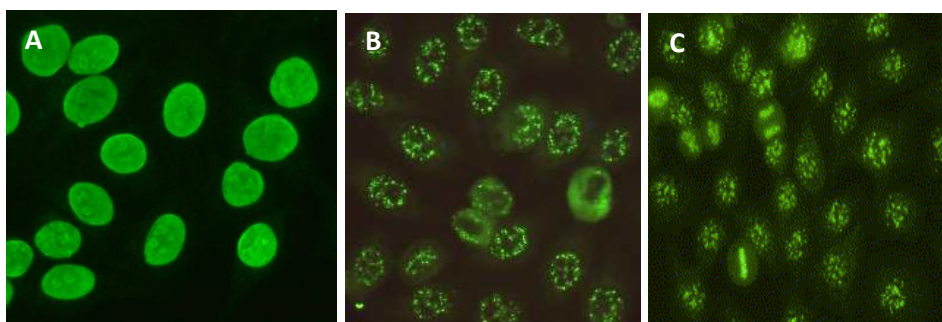


Figura IV- Marcação de anticorpos antinucleares por técnica de IFI. Padrão Homogêneo (A), padrão mosqueado (B) e padrão nuclear (C). Adaptado de Wiik, A. (Wiik, A. *et al* 2010).

Doentes com padrão homogéneo parecem ter títulos mais altos de ANA e uma maior incidência de anticorpos AML do que doentes que apresentam um padrão mosqueado (Czaja 2008). A resposta à terapêutica com corticosteróides é independente do padrão observado pela técnica de IFI. Alguns estudos referem que a seropositividade para os ANA parece estar associada à presença de HLA-DR4 na HAI tipo 1 e a um melhor prognóstico de evolução da doença do que em doentes com ANA negativos (Czaja *et al* 1997).

1.2.6.2. Anticorpos anti-músculo liso (AML)

Os anticorpos AML estão presentes frequentemente nas hepatites autoimunes e são dirigidos contra componentes do citoesqueleto tais como a actina, a tubulina, a vimentina, a desmina e a esqueletina (Orts Costa 2004; Manns e Vogel 2006). Ocorrem frequentemente em associação com os ANA e estão, tal como eles, presentes numa grande diversidade de doenças hepáticas e não-hepáticas, tais como as doenças reumáticas. Os autoanticorpos anti-actina são o principal componente do que foi denominado anticorpos anti músculo liso. Estes anticorpos apresentam especificidade para o componente actina do citoesqueleto e, normalmente são detetados por IFI utilizando como substrato secções finas de fígado, rim e estômago de rato, (figura V).

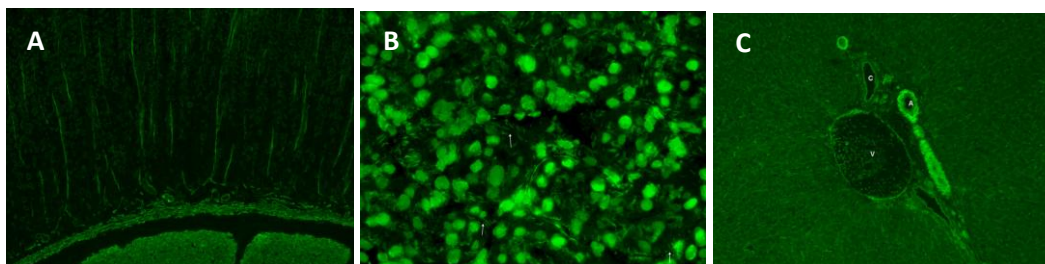


Figura V – Marcação de anticorpos anti-músculo liso por técnica de IFI. Observa-se o padrão VGT caraterístico da presença de anticorpos anti-actina em estômago (A), em rim (B) e em figado (C) de rato. Adaptado de Rodrigues F. (Rodrigues F. *et al*, 2012).

O fígado e o rim apresentam fluorescência da parede dos vasos, enquanto no estômago sobressai a muscularis mucosa. A observação do rim requer especial atenção, pois permite a visualização dos vasos, glomérulos e túbulos, o denominado padrão VGT, característico da actina, que se reveste de maior especificidade para a HAI (Granito *et al* 2006). O padrão V atribuído à vimentina, também está presente em doenças inflamatórias hepáticas não imunes, bem como noutras doenças autoimunes que não afetam o fígado ou mesmo outras doenças víricas. O padrão VG (marcação de vasos e glomerolos) e o padrão VGT são mais específicos da HAI (Vergani *et al* 2004). Os AML também podem ser detetados por IFI, utilizando fibroblastos ou células HEP-2 (figura VI).

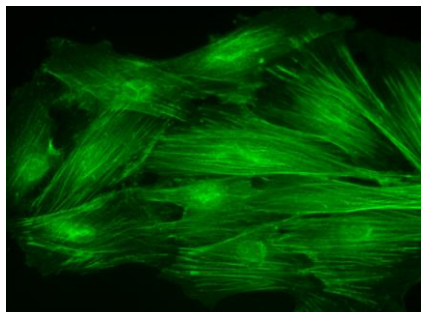


Figura VI – Padrão de IFI dos anticorpos anti- actina em células HEP-2. Adaptado de Rodrigues F. (Rodrigues F. *et al*, 2012).

Os anticorpos AML e os ANA são os marcadores imunoserológicos da HAI tipo 1. Os anticorpos AML são direccionados contra vários componentes, o mais importante é a actina mas a IFI também pode detetar anticorpos anti-tubulina e filamentos intermediários. Estudos recentes sugeriram que são os anticorpos anti actina que têm especificidade para as doenças hepáticas autoimunes e foram reconhecidos como melhores marcadores para a o diagnóstico da HAI do que os anticorpos AML (Czaja *et al*. 1996).

Estudos comparativos entre a presença de anticorpos anti-actina F do tipo IgG por testes imunoenzimáticos e a deteção de anticorpos anti-AML por IFI mostraram que os anticorpos anti-actina F estavam presentes na HAI quando os títulos de AML eram superiores a 1:160 (Czaja 2008). Contudo, também tem sido referido que para valores de AML inferiores a 1:40 os anticorpos anti-actina F podem estar presentes (Granito *et al* 2006, Jaskowski *et al* 2007). No mesmo estudo, foram detetados anticorpos anti-actina F

em 20% dos doentes com hepatite vírica aguda. Czaja e colaboradores, sugeriram que a presença de anticorpos anti-actina F em doentes com HAI tipo 1 estava associada a um início mais precoce da doença, uma pior resposta ao tratamento com corticosteróides, uma evolução mais frequente para falência hepática e uma maior necessidade de transplante hepático (Czaja 2005).

Deste modo, uma vez que existe um número significativo de doentes com HAI tipo 1 sem anticorpos AML mas com anticorpos anti-actina F, Jaskowski e colaboradores defendem a realização de testes de pesquisa destes anticorpos sempre que exista suspeita desta patologia (Jaskowski *et al* 2007). No entanto, outros autores defendem a utilização deste teste apenas como teste de segunda linha, dada a menor sensibilidade destes testes face à IFI (Villalta *et al* 2008).

1.2.6.3. Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)

Os ANCA são anticorpos dirigidos contra o citoplasma dos neutrófilos e monócitos. Estes autoanticorpos são detetados por IFI utilizando granulócitos fixados com etanol, podendo ser subdivididos em dois subtipos principais de acordo com o seu padrão de imunofluorescência: padrão citoplasmático (c-ANCA) e padrão perinuclear (p-ANCA) (figura VII). Têm ambos valor de diagnóstico e de prognóstico nas vasculites, tais como a granulomatose de Wegener (c-ANCA) e a poliangite microscópica (p-ANCA). A proteinase-3 (PR3) foi identificada como sendo o principal autoantigénio para o padrão c-ANCA na granulomatose de Wegener e a mieloperoxidase (MPO) para o padrão p-ANCA. Os ANCA apresentam ainda uma elevada prevalência noutras doenças inflamatórias intestinais (principalmente na colite ulcerosa) e na CEP (Lindgren *et al* 2000).

O padrão p-ANCA clássico é devido a um artefacto decorrente da fixação dos neutrófilos pelo etanol, levando à migração das proteínas catiónicas (tais como a MPO) para a membrana nuclear carregada negativamente; quando os neutrófilos são fixados pelo formol, não ocorre essa migração observando-se um padrão citoplasmático devido à localização “*in situ*” das proteínas. O padrão dos ANCA observado na HAI, padrão p-ANCA atípico ou X-ANCA, é diferente do padrão clássico p-ANCA, apresentando um

reforço mais perinuclear em etanol, sem migração para o citoplasma em formol. Estes autoanticorpos também são encontrados na CEP (60-92%), na colite ulcerosa (CU) (60-87%) e na doença de Crohn (5-25%), e parecem reagir com componentes do núcleo dos neutrófilos, nomeadamente com uma proteína de 50 Kda específica da membrana nuclear da série mielóide. Estes estudos sugerem que o termo “p-ANCA atípico” não é o mais correto, uma vez que os antígenos alvo não são citoplasmáticos e foi proposto o termo “perinuclear anti-neutrophil nuclear antibodies” (p-ANCA) como sendo o mais indicado para descrever estes autoanticorpos (Terjung *et al* 2000; Terjung e Worman 2001; Vergani *et al* 2004).

Estudos recentes, revelaram a presença de elevados títulos de p-ANCA em doentes com HAI tipo 1 (prevalência de 40-96%) e, mais raramente, em doentes com CBP (prevalência 0-39%) (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004). Os antígenos predominantes são a lactoferrina, a elastase e o “bactericidal permeability increasing protein” (BPI) (Lindgren *et al* 2000). Não foram detetados ANCA em doentes com HAI tipo 2. A deteção dos ANCA pode ser um teste útil no despiste de HAI tipo 1, principalmente nos casos em que a pesquisa para os ANA/AML/anti-LKM1 é negativa (hepatite criptogénica) (Dalekos *et al* 2002).

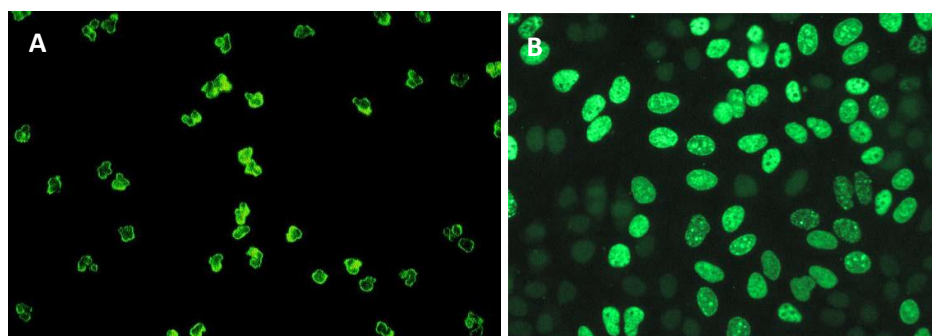


Figura VII – Representação de padrões de ANCA por técnica de IFI em neutrófilos humanos: Padrão c-ANCA (A) e padrão p-ANCA (B). Adaptado de Zachou (Zachou *et al*, 2004).

Uma vez que a prevalência dos ANCA na CBP é baixa, estes autopanticorpos podem revelar-se úteis para a distinção das duas patologias em síndromes de sobreposição (Dalekos *et al* 2002). Contudo, devido à sua falta de especificidade para o diagnóstico de HAI tipo 1, não se recomenda a sua utilização na rotina (Zachou *et al* 2004).

1.2.6.4. Anticorpos anti-antigénio hepático solúvel e anti-antigénio do fígado e pâncreas (SLA/LP).

Os anticorpos anti-antigénio hepático solúvel (anti-SLA) e anti-antigénio do fígado e pâncreas (anti-LP) foram descritos independentemente em 1987 e 1983, respetivamente, pensando tratar-se de anticorpos diferentes (Invernizzi *et al* 2007). No entanto em 2000, Wies e colaboradores demonstraram que o antigénio específico de ambos era uma ribonucleoproteína de transferência, envolvida na incorporação de selenocisteína nas cadeias polipeptídicas (Wies *et al* 2000; Czaja e Norman 2003; Bogdanos *et al* 2004). A sua descoberta levou, em 1994, à subclassificação em HAI tipo 3. Testes genéticos, serológicos e clínicos, e a concordância comum de anti-SLA com os marcadores sorológicos de HAI tipo 1 e tipo 2 demonstraram que a sua presença não justifica um novo subtipo e atualmente, doentes com anticorpos anti-SLA/LP são considerados como tendo HAI tipo 1 (Orts Costa, 2004 e Czaja, 2010).

Os anticorpos anti-SLA/LP podem ser detetados em doentes com HAI, como marcadores isolados ou em associação com AML e/ou ANA. Embora se associem geralmente à HAI tipo 1, estudos recentes revelaram também a sua associação à HAI tipo 2, em crianças com colangite autoimune e infeção pelo vírus da hepatite C (Dalekos *et al* 2002; Bogdanos *et al* 2004; Manns e Vogel 2006; Rigopoulou *et al* 2007, Czaja 2010).

Os anticorpos anti-SLA/LP são os autoanticorpos mais específicos detetados na HAI tipo 1, estes autoanticorpos são detetados em 11-22% dos adultos doentes norte-americanos e norte europeus com diabetes tipo 1 e HAI e 18-44% das crianças com HAI tipo 2. Também têm sido descritos em 14-20% dos pacientes com hepatite crónica criptogénica. Os anticorpos para o SLA têm um diagnóstico especificidade de 99% para a HAI e a sua presença na hepatite crónica de natureza desconhecida obriga à consideração de uma base autoimune para justificar a atividade inflamatória (Czaja 2010). São por este motivo considerado um marcador altamente específico da HAI com importância no prognóstico (Czaja 2010). Não são detetados por IFI, recorrendo-se a ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA e imunoblot, utilizando antigénios recbinantes (Baeres *et al* 2002 e Czaja 2010).

Vários estudos sugerem que doentes com anticorpos anti-SLA/LP têm um curso mais severo da doença, apresentando recaídas mais frequentes, embora se desconheça o seu papel patogénico (Baeres *et al* 2002; Vergani *et al* 2004; Bogdanos *et al* 2008 e Czaja 2010). Os anticorpos para o SLA têm atributos prognósticos uma vez que identificam os pacientes com alterações histológicas mais graves, exigem maior duração de tratamento, estão presentes numa recaída após retirada da droga e têm maior frequência de transplante de fígado ou morte por insuficiência hepática. Apenas 15% dos pacientes brancos norte-americanos com HAI expressam anti-SLA, mas a sua deteção precoce pode prever as dificuldades do tratamento (Czaja 2010).

Estes autoanticorpos são frequentemente os únicos marcadores serológicos de HAI. E a sua elevada especificidade para a HAI, a presença frequente na hepatite crónica criptogénica, a estreita associação com HLA DRB1 * 0301, grave doença histológica e dependência de tratamento fizeram dos anticorpos anti-SLA os mais promissores marcadores sorológicos de prognóstico na HAI (Czaja 2010). Os resultados “borderline” obtidos pela técnica de ELISA devem ser confirmados por imunoblotting (Baeres *et al* 2002 e Czaja 2010).

1.2.6.5. Autoanticorpos contra o recetor da asialoglicoproteína (anti-ASGP-R)

O recetor da asialoglicoproteína (ASGP-R), também designado lectina hepática, é uma proteína transmembranar tipo II, específica da membrana hepatocelular (Bogdanos *et al* 2008). A sua principal função é a internalização da asialoglicoproteína através da ligação dos resíduos terminais de galactose às vesículas membranares.

Os anticorpos para o ASGP-R são observados em aproximadamente 90% dos doentes com HAI e pode coexistir com ANA, AML e anti-LKM1. São considerados marcadores universais de HAI pois estão presentes em ambos os tipos de HAI (em 75% das crianças com HAI tipo 1 e 40% com HAI tipo 2) e podem estar presentes em doentes que são negativos para os anticorpos convencionais. Contudo, não são específicos e podem

também ser encontrados em hepatites víricas, hepatites induzidas por drogas e CBP (Orts Costa 2004, Manns e Vogel 2006 e Czaja 2010).

Os níveis de anticorpos anti-ASGP-R correlacionam-se com a atividade inflamatória e a sua persistência ou desaparecimento durante a corticoterapia reflete a adequação da resposta ao tratamento traduzindo-se em remissão ou recaída da doença, deste modo pode ser utilizado como marcador adicional para monitorizar a eficácia do tratamento (Dalekos *et al* 2002; Luxon 2003; Zachou *et al* 2004; Manns e Vogel 2006 e Czaja 2010). Estes atributos indicam que anti-ASGPR pode ser útil na definição dos pontos finais do tratamento podendo ser o único marcador de prognóstico da hepatite autoimune, que tem importância quando está ausente (Czaja 2010).

Contudo, dada a sua baixa especificidade e as dificuldades inerentes à sua determinação, não é recomendado a sua utilização na rotina (Bogdanos *et al* 2008).

1.2.7. Autoanticorpos na hepatite autoimune tipo 2

1.2.7.1. Anticorpos anti-microsossomais do fígado e rim (anti-LKM)

Sob a denominação de anticorpos anti-microsossomas do fígado e rim (anti-LKM) encontra-se um grupo heterogêneo de autoanticorpos que reagem em IFI com o citoplasma dos hepatócitos e das células dos túbulos renais. Os anticorpos anti-microsossomas hepáticos (anti-LM) foram incluídos neste grupo, apesar de não reagirem com os túbulos renais.

Os autoanticorpos anti-LKM foram detetados pela primeira vez por IFI por Rizeto e colaboradores em 1973 (Invernizzi *et al* 2007). Foram identificados três tipos de anticorpos anti-LKM denominados de 1 a 3, sendo o mais importante para o diagnóstico da HAI tipo 2 o anticorpo anti-LKM1.

Os anticorpos anti-LKM1 são detetados po IFI em cortes de tecido triplo de rato (fígado, rim e estômago) apresentando uma fluorescência homogênea do citoplasma dos hepatócitos e da porção P3 dos túbulos renais próximos. Os túbulos distais são habitualmente negativos ou fracamente positivos (figura VIII). Esta marcação permite

distinguir os anticorpos anti-LKM1 dos anticorpos anti-mitocondriais (AMA), que marcam igualmente os túbulos proximais e distais.

Os anticorpos anti-LKM1 têm uma prevalência 3 a 6% nos doentes com HAI (Orts Costa JA 2004), sendo o principal autoantigénio identificado o citocromo P450 2D6 (CYP2D6). Foram identificados pelo menos quatro epitópos lineares diferentes deste autoantigénio. Os epitópos imunodominantes do P450 2D6 são os aminoácidos 257-269 e o 321-351, que são reconhecidos em aproximadamente 70% e 50% dos casos respetivamente (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004).

Os anticorpos anti-LKM1 são igualmente encontrados até 7% dos doentes com hepatite crónica C (VHC). No entanto, os epítópos do autoantigénio P450 2D6 reconhecidos pelos autoanticorpos anti-LKM1 são diferentes na HAI-2 e nos doentes com VHC, contudo, foram reconhecidas homologias entre epítópos na molécula do P450 2D6 e as proteínas codificadas pelo genoma do vírus da hepatite C e do citomegalovirus (Vergani e Mieli-Vergani 2008). Os anticorpos na HAI são mais homogéneos, os títulos são mais altos e os principais epítópos no P450 2D6 são pequenos e lineares; por outro lado na hepatite C os anticorpos anti-LKM1 são mais heterogéneos, com múltiplos epitópos, muitos dos quais conformacionais.

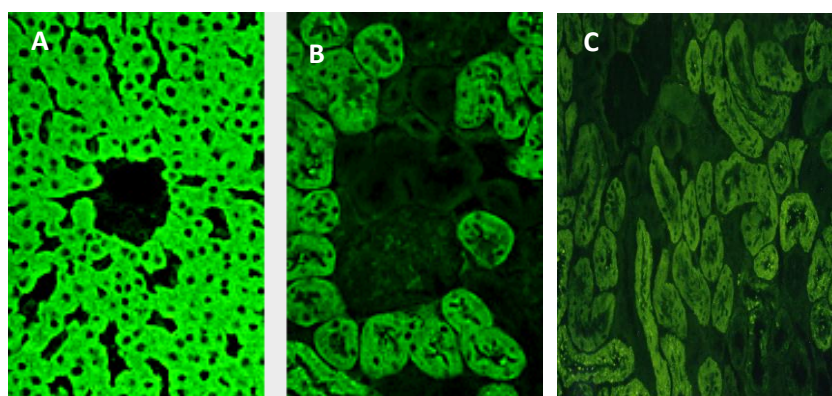


Figura VIII – Marcação de anticorpos anti-LKM1 por IFI. Fluorescência citoplasmática em hepatócitos (A), em (B) a marcação mais intensa dos túbulos proximais e a medula do tecido renal negativo e em (C) as células parietais são negativas. Adaptado de Liver Autoantibodies (Unisersity of Birmingham, 2012).

Os mecanismos que levam à produção de autoanticorpos anti-LKM1 e o seu papel patogénico a nível hepatocelular ainda não são conhecidos. Foi sugerido que algumas

infecções víricas pelo vírus Herpes simplex e outros vírus associados possam desencadear a produção de autoanticorpos por um mecanismo de mimetismo molecular (Czaja 2005; Czaja 2008).

Em termos clínicos é importante o screening dos autoanticorpos anti-LKM1 antes da terapia com interferon-alfa nos doentes com VHC, uma vez que a sua utilização em doentes com HAI pode exacerbar a doença. Por outro lado, o tratamento com corticosteróides num doente com VHC pode aumentar a replicação viral (Daleko *et al* 2002; Orts Costa 2004).

Os autoanticorpos anti-LKM2 foram detetados nalguns casos de hepatites induzidas por fármacos (ácido tienílico, halotano, dihidralazina e agentes anticonvulsivantes) mas nunca em doentes com HAI (Orts Costa 2004). O autoantigénio alvo é o P450 2C9 (CYP2C9). Os anticorpos anti-LKM2 podem pesquisar-se por IFI em tecidos de roedores. No fígado de rato, os anticorpos anti-LKM2 marcam fortemente os hepatócitos centrolobulares, apresentando uma fluorescência fraca dos hepatócitos periportais. Os túbulos renais proximais dos glomérulos marcam mais intensamente (figura IX).

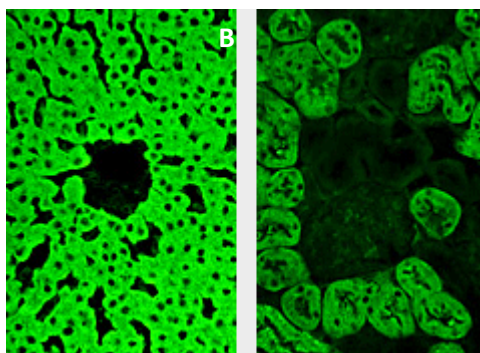


Figura IX – Imagens de anticorpos anti-LKM2 por IFI. Em (A) a fluorescência mais intensa dos hepatócitos centrolobulares e em (B) a marcação mais intensa dos túbulos proximais. Adaptado de Liver Autoantibodies (Unisersity of Birmingham, 2012).

Os autoanticorpos anti-LKM3, isolados ou em associação com os autoanticorpos anti-LKM1, são detetados em aproximadamente 5-10% dos doentes com HAI tipo 2. O principal autoantigénio é da família das 1-UDP-glucuroniltransferases (1-UGTs), de 55 Kda. Estes autoanticorpos foram inicialmente descritos em aproximadamente 13% dos

doentes com hepatite crónica Delta (Orts Costa 2004). Recentemente, também foram descritos em doentes com hepatite crónica C, tratando-se provavelmente de fenómenos autoimunitários observados nesta patologia (Orts Costa 2004). Os anticorpos anti-LKM1 em tecido de rato, mas também marcam os microssomas da tiróide, adrenal e pâncreas de primata.

Os anticorpos anti-LM foram descritos pela primeira vez em doentes com hepatite induzida pela dihidralizina sendo o principal antigénio alvo o citocromo P450 IA2 (CYP1A2) (Dalekos *et al* 2002). O padrão de fluorescência em tecidos de rato apresenta uma fluorescência limitada à camada de hepatócitos à volta do espaço centrolobular sem marcação do tecido renal (figura X).

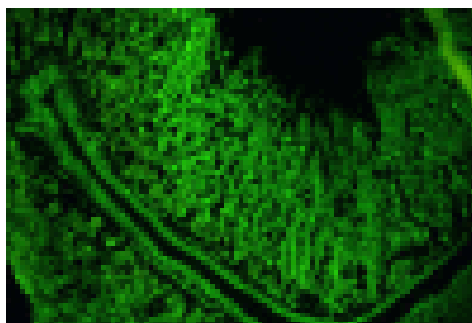


Figura X – Imagem de IFI sugestiva da presença de anticorpos anti-LM. Presença de anticorpos anti-LM em estômago de rato, a imunofluorescência marca fibras de músculo liso dentro da muscularis mucosa. Adaptado de Zacchou (Zachou *et al*, 2004).

1.2.7.2. Anticorpos anti-citosol hepático tipo 1 (anti-LC1)

Os anticorpos anti-citosol hepático tipo 1 (LC1) foram detetados pela primeira vez em 1988 em doentes com HAI tipo 2. O autoanticorpo é específico de órgão mas não específico de espécie (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004). Estes autoanticorpos são detetados em aproximadamente 30% dos doentes com HAI tipo 2, sendo na maioria dos casos (cerca de 70%) acompanhados pelos autoanticorpos anti-LKM1. No entanto, também já foram detetados em doentes com HAI tipo 1, hepatite C e CEP, sendo o único marcador imunológico detetado em aproximadamente 10% dos doentes com HAI (Invernizzi *et al* 2007). Os anticorpos anti-LC1 em 24 a 32% aparecem em associação com anti-LKM1, e são

considerados um segundo marcador da HAI tipo 2. Como os anticorpos anti-LKM1, eles são expressos principalmente em crianças e jovens adultos (20 anos ou menos) e raros em adultos acima dos 40 anos (Czaja 2010).

Estes autoanticorpos podem ser detetados por técnicas de ELISA, contraímunoelctroforese, imunoblot ou IFI. Em fígado de rato, por IFI, os anticorpos anti-LC1 apresentam fluorescência citoplasmática dos hepatócitos respeitando a camada hepatocelular à volta das veias centrais (figura XI). O rim não apresenta fluorescência. A detecção dos autoanticorpos anti-LC1 por IFI é mascarada quando estão presentes autoanticorpos anti-LKM1, sendo necessário recorrer a outras técnicas de detecção, como Elisa e o imunoblotting (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004; Manns e Vogel 2006).

A formiminotransferase-ciclodesaminase (FCTD), uma proteína de 58KDa, envolvida no metabolismo dos folatos, foi identificada como alvo molecular dos autoanticorpos anti-LC1 (Invernizzi e col. 2007; Bogdanos *et al* 2008).

A sua importância no prognóstico advém do facto de serem úteis no estabelecimento do diagnóstico de HAI quando os anticorpos ANA, AML, e anti-LKM1 aparecem negativos. Estes doentes respondem tipicamente à terapia com corticosteróides, e a presença de anti-LC1 é a chave para o reconhecimento da doença (Czaja 2010).

A presença de autoanticorpos anti-LC1 parece correlacionar-se com a atividade da doença podendo ser útil como marcador de atividade hepatocelular inflamatória residual na HAI (Dalekos *et al* 2002; OrtsCosta 2004; Manns e Vogel 2006).

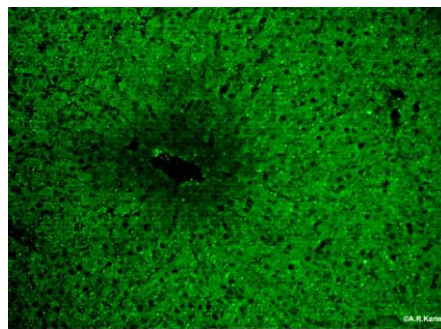


Figura XI – Imagem de IFI de um soro com anticorpos anti-LC1. Forte marcação na zona centolobular no fígado em tecido triplo de rato. Adaptado de Liver Autoantibodies (Unisersity of Birmingham, 2012).

1.2.7.3. Autoanticorpos na hepatite autoimune na APECED

Tal como acontece na HAI tipo 2, a hepatite na APECED está associada à presença de autoanticorpos para proteínas do citocromo P450 (CYP1A2 e CYP2A6), resultando no padrão de fluorescência de anticorpos anti-LM e anti-LKM, respetivamente (Dalekos *et al* 2002). A deteção destes autoanticorpos pode ser uma ajuda para o diagnóstico de HAI nesta síndrome dada a alta especificidade dos anticorpos anti-LM (Zachou *et al* 2004).

A prevalência de ANA em doentes com APECED é elevada (22%). Contudo, não apresenta relação com a presença ou ausência de hepatite associada pelo que não é útil a sua determinação nestas situações (Dalekos *et al* 2002; Zachou *et al* 2004).

1.3. Cirrose Biliar primária

A cirrose biliar primária (CBP) é uma doença hepática autoimune rara colestática crónica de etiologia desconhecida, na qual os canais biliares intrahepáticos são progressivamente destruídos por um processo inflamatório, com destruição imunomediada dos mesmos resultando em colestase, cirrose e falência hepática (Crosignani *et al*, 2008). A CBP é uma doença de etiologia provavelmente autoimune, estando associada a outras doenças autoimunes como o síndrome de Sjögren, esclerodermia e tiroidite (Washington 2007 e Corpechot 2010).

A sua prevalência varia mundialmente, sendo elevada no Norte da Europa, principalmente na Inglaterra e nos Países Escandinavos, e nos Estados Unidos, tendo nestes países uma prevalência de aproximadamente 40 por 100 000 habitantes. A CBP afeta predominantemente mulheres com idade superior a 40 anos (Poupon R. 2010).

A CBP tem patogenia multifatorial, com fatores genéticos e ambientais a contribuir para o aparecimento e progressão da doença (Selmi *et al* 2004). Estudos epidemiológicos recentes identificaram fatores de risco para o aparecimento de CBP, como infeções urinárias de repetição, história pessoal de tabagismo e uso de terapêuticas hormonais de substituição, que promovem o aumento da apoptose nas células epiteliais dos ductus

biliares podendo causar a atividade autoimune característica da CBP (Corpechot C. 2010). Não se conhece o motivo exato para apenas as células epiteliais do trato biliar serem afetadas, uma vez que o antigénio piruvato desidrogenase está presente em todos os tecidos. (Lleo *et al* 2008). Até 20% dos doentes apresenta simultaneamente outra doença autoimune (nomeadamente esclerodermia ou tiroidite) e em cerca de 10% dos casos surgem simultaneamente critérios de HAI, podendo nesses casos denominar-se síndrome de sobreposição ou “overlap” (Poupon R. 2010)

Tem sido dada particular atenção ao estudo da associação com agentes químicos e infecciosos. A maior prevalência de infeções do trato urinário em doentes com CBP causadas por *Escherichia coli* evidência que entre todas as estirpes bacterianas, esta bactéria é a que apresenta maior propensão para desencadear a doença através de mecanismos de mimetismo molecular. Estudos recentes realizados por Giogini e colaboradores indicaram o *Novosphingobium aromaticivorans*, um microorganismo gram negativo ubiquitário, como o melhor candidato para induzir a CBP (100 a 1000 vezes superior à *E.coli*) (Giogini *et al* 2005).

Alguns doentes com CBP permanecem vários anos assintomáticos. À altura do diagnóstico metade dos doentes estão assintomáticos sendo o diagnóstico determinado através da realização de análises de rotina, enquanto outros desenvolvem sintomatologia após 2 a 4 anos de evolução da doença. Os sintomas mais frequentes são a fadiga (21%) e o prurido (19%) sendo que este último se deve à deposição dos sais biliares (Washington 2007). São raros os doentes que apresentam inicialmente sinais de doença hepática avançada com complicações de hipertensão portal (ascite, encefalopatia hepática, hemorragia de varizes esofágicas) (EASL 2009).

O diagnóstico da CBP faz-se pela associação da história clínica, dados serológicos e histológicos e baseia-se em três critérios: padrão de enzimas colestásico com mais de seis meses, presença de AMA e histologia compatível. A presença de dois destes critérios permite um diagnóstico provável sendo necessária a presença de três para o diagnóstico definitivo (Crosignani *et al* 2008).

Analiticamente encontram-se quadros de colestase com elevação da fosfatase alcalina e da gamaglutamiltransferase associando-se uma elevação mínima ou moderada das transaminases e um aumento da concentração de bilirrubina numa fase mais tardia da doença, sendo também comum o aumento do colesterol sérico total (Heathcole 2000 e

Poupon R. 2010). O padrão de imunoglobulinas séricas na CBP caracteriza-se por um aumento da fracção IgM, e níveis de IgA habitualmente normais, tendo no entanto têm sido descritos casos de défice seletivo de IgA (Heathcote 2000).

No exame histológico aparece com frequência a chamada “lesão florida” com infiltrado inflamatório, destruição das células epiteliais dos canais biliares e descontinuidade da membrana basal dos ductos biliares (Washington 2007). A confirmação histológica já não é obrigatória para o diagnóstico da CBP (EASL 2009). A biópsia hepática é considerada imperativa apenas nos casos de negatividade dos AMA, bioquímica atípica ou suspeita de associação com outra causa de doença hepática tornando-se neste caso determinante na conclusão diagnóstica e decisão terapêutica como foi demonstrado pela descrição de um caso clínico por uma equipa de médicos do Hospital Sousa Martins na Guarda (Pinho *et al* 2012). Ainda assim é importante referir que a histologia tem valor prognóstico e auxilia decisões terapêuticas (Poupon 2010).

Foram feitas tentativas para criar um sistema de pontuação semelhante ao utilizado para a HAI, não tendo sido validado até à data. Devido à especificidade dos marcadores imunológicos e bioquímicos, a CBP pode ser diagnosticada atualmente sem recorrer a biópsia, embora esta seja necessária para determinar o estadiamento da doença (Heathcote 2000; Jones 2000).

A CBP não tem cura, e sem tratamento pode evoluir para cirrose e insuficiência hepática num período de 10 a 20 anos. O tratamento com ácido ursodesoxicólico (UDCA) e colestiramina, pode reduzir alguns dos sintomas, permitindo assim uma melhoria na qualidade de vida dos doentes. O UDCA é um fármaco pouco dispendioso, com poucos efeitos secundários, que diminui a colestase e melhora a função hepática, e tem-se mostrado eficaz no atraso da progressão da doença, aumentando o tempo de sobrevida quando administrado numa fase inicial da doença (Jones 2000). Contudo, um em cada três doentes não responde adequadamente, e poderá necessitar de terapêutica adjuvante e/ou transplante hepático (Poupon 2010). Os fármacos que têm mostrado resultados como terapêutica adjuvante nos casos resistentes são o budesonido e a prednisolona, embora o seu uso não seja consensual (EASL 2009). A colestiramina absorve os sais biliares no intestino, diminuindo assim o prurido associado à presença destes na corrente sanguínea. Os corticóides não são eficazes no tratamento da CBP (Washington 2007). Num estadio avançado da doença, quando a maioria dos ductos biliares foram destruídos, o transplante

hepático é o único tratamento eficaz e a taxa de recidiva da doença aos 5 anos ronda os 20% (Giorgini *et al* 2005 e Poupon 2010).

A sobrevida é variável, sendo geralmente de 6 a 12 anos após o início da sintomatologia. São fatores de mau prognóstico nesta doença a presença de icterícia, a perda de canais biliares, a cirrose e a associação a outras doenças autoimunes (Washington 2007).

1.3.1. Marcadores Imunológicos na CBP

1.3.1.1. Anticorpos anti-mitocondriais

Os anticorpos anti-mitocondriais (AMA), considerados marcadores clássicos do diagnóstico, são os marcadores imunológicos mais específicos para o diagnóstico da CBP, presentes em cerca de 90% dos doentes afetados. No entanto, perfis serológicos distintos podem surgir em cerca de 30% dos casos, caracterizados por diferentes variantes de ANA que, ao contrário dos AMA, se relacionam com a gravidade e progressão da doença (Wesierska *et al* 2006, Nakamura *et al* 2007 e Lleo *et al* 2008)

Foram identificados pelo menos nove tipos de antígenos associados aos AMA denominados de M1 a M9 de acordo com as suas especificidades antigénicas e associações clínicas. Os tipos M2, M8 e M9 estão associados à CBP, embora o M2 seja o mais específico desta patologia (McFarlane 2001).

Os AMA estão geralmente presentes em títulos elevados na CBP, não apresentando oscilações com a atividade da doença e persistindo após o transplante hepático ou tratamento imunossupressor (McFarlane 2001).

Os epitopos alvos dos AMA-M2 foram identificados nos anos 80 como componentes do complexo 2-oxoácido desidrogenase (2-OADC), sendo o alvo predominante a subunidade E2 do complexo piruvato desidrogenase presente na membrana interna das mitocôndrias. Posteriormente, foram descritas outras especificidades antigénicas para os anticorpos anti-mitocondriais, nomeadamente outras enzimas do complexo 2-oxoácido desidrogenase incluindo as subunidades E2 da cadeia ramificada do complexo oxoácido desidrogenase (BCOADC, branched chain oxoacid deshydrogenase

complex), do complexo oxoglutarato desidrogenase (OGDC, oxoglutarate deshydroenase complex), a subunidade E3 da proteína de ligação do complexo piruvato desidrogenase (E3BP ou proteína X) e a subunidade E1 α do complexo piruvato desidrogenase (PDC-E1 α) (Tabela V) (Invernizzi *et al* 2007; Bogdanos *et al* 2008).

TabelaV- Antígenios mitocondriais e nucleares na CBP

Antígenios mitocondriais

Subunidades E2 do 2-OADC	PDC-E2*
	OGDC-E2*
	BCOADC-E2*
Complexo piruvato desidrogenase	E3BP*
	PDC E1 α *

Antígenios nucleares

Complexo poro nuclear	Gp210*
	Nucleoporina 62*
Múltiplos pontos nucleares	Sp100
	PML
Centrómero	CENP A,B e C

*Não detetáveis por IFI, utiliza-se imunoblotting ou ELISA para o seu estudo. 2-OADC, complexo 2-oxoácido desidrogenase; PDC, complexo piruvato desidrogenase; OGDC, complexo oxoglutarato desidrogenase; BCOADC, cadeia ramificada do complexo oxoácido desidrogenase; PDC E1 α , Subunidade E1 α do complexo piruvato desidrogenase; CENP, centrómero; PML, antígeno da leucemia promielocítica.

Adaptado de Invernizzi *et al* (Invernizzi, Lleo *et al* 2007).

A pesquisa dos AMA faz-se por IFI em tecido triplo de rato e em células Hep-2, apresentando-se por uma fluorescência citoplasmática granular nas células parietais do estômago (figura XII A), no citoplasma dos hepatócitos (figura XII B) e nos túbulos distais e próximos do rim (figura XII C). A pesquisa em células Hep-2 apresentam uma fluorescência citoplasmática granular (figura XII D). A confirmação da presença de AMA é feita recorrendo a testes de ELISA ou Imunoblot. Os novos ensaios imunoenzimáticos já contêm os três antígenos mitocondriais imunodominantes nomeadamente, PDC-E2, BCOADC-E2 e OGDC-E2. Apesar dos excelentes resultados reportados com estes testes para doentes com CBP, o teste de screening para pesquisa de AMA deve continuar a ser realizado por IFI (Bogdanos et al 2008).

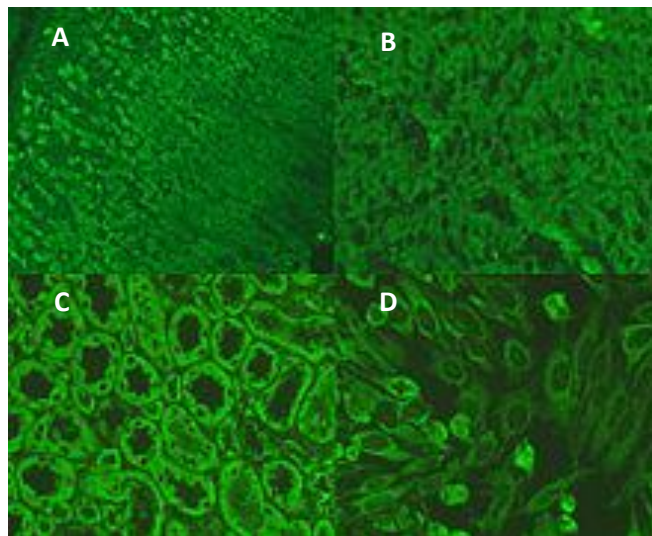


Figura XII- Imagens de IFI de anticorpos anti-mitocondriais. Presença de fluorescência granular nos três tecidos, no estômago com as células parietais positivas (A), no fígado (B) e rim (C) de rato e nas células Hep-2 (D). Adaptado de Rodrigues F. (Rodrigues F. *et al*, 2012).

1.3.1.2. Anticorpos antinucleares

Na CBP, para além dos AMA, também podem ser encontrados por IFI ANA em aproximadamente 1/3 dos doentes. Estes anticorpos foram identificados pela primeira vez

em 1954 (Miescher *et al* 1954) utilizando cortes de tecido ou culturas celulares, mas foi durante a última década que foram reconhecidos os alvos celulares específicos dos ANA na CBP (Invernizzi *et al* 2005). Estes anticorpos incluem proteínas associadas ao padrão de múltiplos pontos nucleares das quais fazem parte a proteína nuclear de 100KDa denominada SP100, o antígeno da leucemia promielocítica (PML, *promyelocytic leukemia*) e a proteína “small ubiquitin-like modifier” (SUMO) e proteínas associadas ao complexo poro nuclear responsáveis pelo padrão membrana nuclear e que são a glicoproteína integrante da membrana nuclear de 210KDa (gp210) e a nucleoporina 62 KDa (p62), (Invernizzi *et al* 2005) (tabela V).

O antígeno Sp100 é uma proteína de 100KDa com um ponto isoelétrico de aproximadamente 5,2, que recebeu esta denominação devido ao padrão pontuado que origina em IFI (“Multiple dots”). São detetados anticorpos anti-Sp100 em aproximadamente 30% dos doentes com CBP e em apenas 3% de doentes com outras patologias (Invernizzi *et al* 2005). A presença de anticorpos anti-Sp100 tem sido associada a uma maior incidência de cirrose, a doentes com uma doença mais avançada e a concentrações de bilirrubina mais elevadas (Invernizzi *et al* 2005).

Os anticorpos anti-PML não são específicos da CBP, podendo estar presentes em doentes com outras patologias, mas nunca em indivíduos saudáveis. Os antígenos Sp100 e PML estão covalentemente ligados ao SUMO, responsável pelo transporte celular destas proteínas (Invernizzi *et al* 2005).

Aproximadamente 30% dos doentes com CBP têm anticorpos contra proteínas de membrana nuclear, sendo responsáveis pelo padrão membrana nuclear e poro nuclear (Lleo, Invernizzi *et al* 2008). A presença de anticorpos anti-poro nuclear está associada a uma progressão mais rápida da doença e por isso de pior prognóstico (Muratori *et al* 2003; Rigopoulou *et al* 2005). Wesierka-Godek e colaboradores defendem a determinação dos anticorpos anti-gp210 em doentes com CBP como indicadores de mau prognóstico e como orientação para a implementação de protocolos de terapêutica (Wesierka-Gadek *et al* 2006). Contudo em doentes com valores elevados de bilirrubinas e um estado histológico avançado a determinação dos anticorpos anti-poro nuclear não parece oferecer qualquer vantagem adicional (Invernizzi *et al* 2007).

Tal como acontece com os AMA, os anticorpos anti-Sp100 e anti-gp210 persistem após transplante hepático, mesmo na ausência de recorrência da doença (Jones 2000).

Os anticorpos anti-centrómero ocorrem em aproximadamente 10% dos casos de CBP e a sua associação com AMA é frequente em doentes com sobreposição de CBP e CREST (Bogdanos *et al* 2008) (figura XIII). Foi demonstrado recentemente que os anticorpos anti-centrómero têm um valor preditivo significativo para o desenvolvimento da hipertensão portal em doentes com CBP (Lleo *et al* 2008).

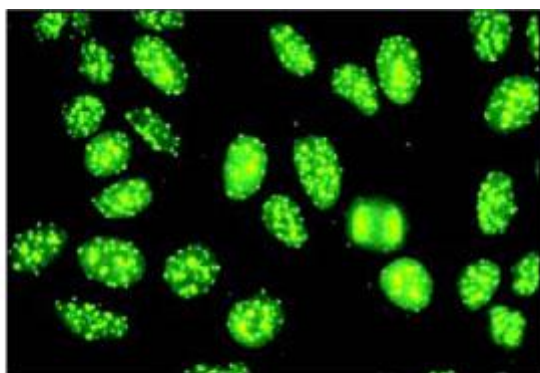


Figura XIII- Imagem de IFI de padrão centrómero em células Hep2

Adaptado Duarte A (Duarte A, 2005).

A pesquisa e identificação de padrões de ANAs associados a antígenos específicos de CBP, nomeadamente o padrão múltiplos pontos nucleares e o padrão membrana nuclear faz-se por IFI em células Hep-2 (figura XIV).

Em doentes com CBP, devido á presença de vários anticorpos com diferentes especificidades o que origina uma sobreposição de padrões de IFI, torna-se difícil a distinção dos vários anticorpos circulantes. De forma a ultrapassar esta limitação técnica, a identificação e determinação da concentração destes anticorpos pode ser feita recorrendo métodos complementares como imunoblotting, imunoprecipitação ou ELISA (Bogdanos *et al* 2008).

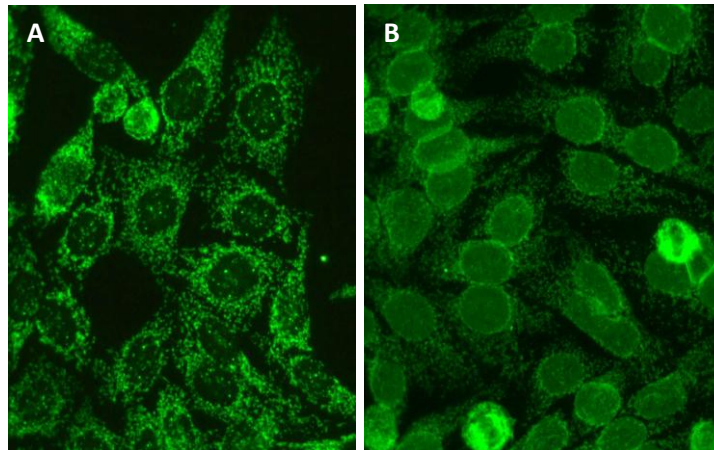


Figura XIV- Imagens de IFI de ANA em células Hep-2. Padrão membrana nuclear (A) e padrão múltiplos pontos nucleares (B). Adaptado de Wiik, A. (Wiik, A. *et al* 2010).

A pesquisa de anticorpos anti-gp210 e anti-centrómero pode ser importante para identificar doentes assintomáticos com maior probabilidade de desenvolver uma forma mais grave de CBP (Bogdanos *et al* 2008).

Se por um lado os AMA são detetados na maioria dos doentes assintomáticos com CBP e podem aparecer muitos anos antes das primeiras manifestações clínicas, bioquímicas ou histológicas e não estão associados com a gravidade ou índice de progressão da doença, os anticorpos anti-poro nuclear ou anti-múltiplos pontos nucleares só são detetados em cerca de 1/3 dos doentes mas a sua presença está associada à forma mais grave ou mais rapidamente progressiva da doença (Invernizzi *et al* 2005).

1.3.1.3. Outros autoanticorpos

Na CBP, contrariamente ao que acontece na HAI e CEP é rara a presença de p-ANCA. Podem estar presentes outros anticorpos como os anticorpos anti-músculo liso, os anticorpos antinucleares e o fator reumatóide.

Os anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENAS), utilizados principalmente para avaliação de patologias reumáticas, podem também ser detetados em doentes com CBP (30%), na CEP (12%) e na HAI (2%). Na CBP os ENAs mais frequentes

são os anticorpos anti-SSA/RO52 e o anti-centrómero, e a sua presença foi associada a um estadiamento histológico avançado, níveis elevados de bilirrubina e IgM (Czaja 2008).

1.4. Objetivo

A determinação de autoanticorpos tem um papel predominante no diagnóstico da doença hepática autoimune, uma vez que o diagnóstico e tratamento precoces destas doenças são fundamentais para a prevenção da alta morbidade e mortalidade associadas a estas patologias. Neste contexto, a introdução de novos testes de pesquisa de autoanticorpos na prática clínica da rotina laboratorial, mais sensíveis e específicos, justifica o estudo da importância da determinação dos vários Autoanticorpos utilizados para o diagnóstico das doenças hepáticas autoimunes, bem como a avaliação da metodologia mais adequada à realidade laboratorial.

Assim este trabalho tem por objetivo a pesquisa e identificação de autoanticorpos em uso clínico: ANA, AMA, AML, ANCA, SLA/LP, anti-LKM, anti-LC1 e anti-actina F, em doentes com suspeita de HAI e CBP em que foi excluída causa vírica, alcoólica e tóxica.

O trabalho incidiu particularmente na comparação dos resultados do perfil de autoanticorpos de pedidos feitos ao exterior e realizados na rotina laboratorial com os resultados obtidos recorrendo à utilização do Kit BlueDot liver da D-tek®.

Com este trabalho pretendeu-se determinar a relevância da introdução da pesquisa dos novos autoanticorpos e avaliar a relação custo/benefício da implementação do kit BlueDot liver da D-tek® na rotina laboratorial do serviço de Patologia Clínica do Hospital Pedro Hispano.

Capítulo II: Material e métodos

2. Material e métodos

2.1. População em estudo

Durante um período de quinze meses compreendido entre Abril de 2011 e Julho de 2012 foram guadas 81 amostras de sangue periférico, relativas a doentes de ambos os sexos e de todas as idades com possível diagnóstico de doença hepática autoimune, e que não tinham iniciado tratamento. Estes eram provenientes da consulta externa e do internamento da especialidade de medicina interna e gastroenterologia, aos quais foi pedida a determinação de autoanticorpos.

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas 3500 r.p.m durante 10 minutos, o soro foi separado em aliquotas e congelado a -70°C.

Posteriormente estes doentes foram sujeitos a um processo de seleção com recurso à consulta do processo clínico individual de forma a excluir do estudo hepatites víricas, tóxicas e alcoólicas. Da análise desta população resultou a seleção da amostra a ser estudada.

A amostra é constituída por 31 doentes, de ambos os sexos e de variadas idades com alterações hepáticas analíticas, alterações histológicas e com forte suspeita de doença hepática autoimune. A estas amostras foi efetuada a pesquisa de autoanticorpos: ANA, AMA, AML, ANCA, anti-SLA/LP, anti-LKM, anti-LC1 e anti-actina F.

2.2. Metodologia

As amostras foram submetidas à pesquisa no soro de autoanticorpos utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), imunoenensaio enzimático (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e Imunoblot.

A técnica de IFI foi utilizada para a pesquisa dos anticorpos anti-LC1 e anti-SLA em células HEP-2 e para a pesquisa dos anticorpos anti-LKM1 em tecido triplo de rato.

A técnica de ELISA foi usada para determinar os anticorpos anti-mitochondriais M2 e os anticorpos anti-actina F.

A técnica de imunoblot em estudo a implementar, realiza a pesquisa dos anticorpos anti-M2, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA e anti-actina F.

Deste modo foi efetuada a comparação entre as metodologias de IFI em células HEP2 (metodologia atual) e Imunoblot (metodologia em estudo) para a pesquisa de anticorpos Anti-LC1 e anti-SLA. Para a pesquisa de anticorpos anti-LKM1 foram comparadas as metodologias IFI em tecido triplo de rato (metodologia atual) e Imunoblot (metodologia em estudo), e para a pesquisa de anticorpos anti-M2 e anti-actina F as metodologias ELISA (metodologia atual) e Imunoblot (metodologia em estudo).

2.2.1. Imunofluorescência indireta

2.2.1.1. Fator Antinuclear em células Hep-2

O teste de IFI é baseado na ligação do autoanticorpo presente no soro do doente, com o antígeno das células HEP-2 (células de carcinoma laringeo humano). Conforme o local de ligação do autoanticorpo, são expressos vários padrões de ANA, que podem ser nucleares, citoplasmáticos, do aparelho mitótico ou mistos (figura XV). Após a ligação do anticorpo ao substrato, a reação será revelada por uma imunoglobulina da classe IgG, conjugada com fluoresceína. A lâmina de vidro coberta pela cultura de células Hep-2, será, depois de processada, observada ao microscópio de fluorescência.

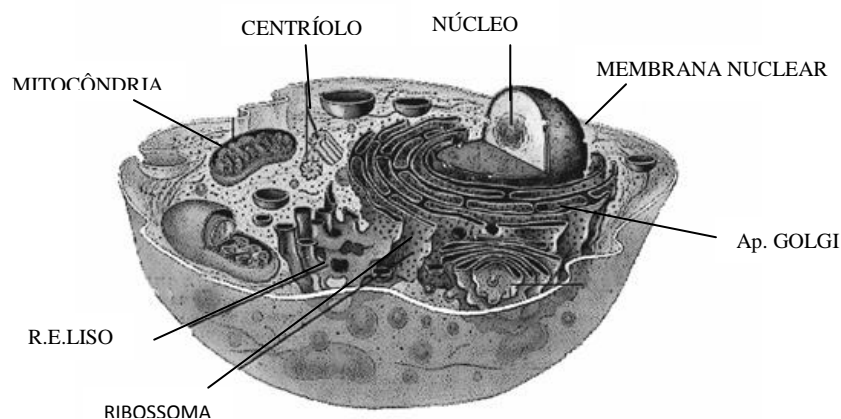


Figura XV-Estrutura das células Hep-2

As células Hep-2 possuem características que fazem desta técnica de IFI uma excelente técnica para o rastreio dos ANA. São células que se podem propagar indefinidamente em cultura de células, e como tal o substrato pode ser mais facilmente padronizado; permitem padronizar todo um espectro de antígenios humanos e estão mais próximo da especificidade contra os quais os anticorpos são produzidos, possibilitando que um maior número de anticorpos seja detetado e originando uma maior taxa de detecção; possuem uma elevada sensibilidade, possibilitando que anticorpos contra diversos tipos de antígenios possam ser detetados, em simultâneo, num único substrato; têm um núcleo maior, em que os diferentes anticorpos antinucleares podem ser mais facilmente diferenciados pelos seus padrões de fluorescência; têm um grande número de mitoses, logo os anticorpos anti-estruturas específicas das mitoses e os anticorpos anti-centrómeros são diagnosticados com mais segurança.

A elevada sensibilidade da técnica de IFI em substrato de células Hep-2, contrasta com a sua baixa especificidade: apenas alguns padrões são específicos de alguns antígenios e muitas especificidades diferentes dão origem a padrões semelhantes. Para além disso, muitos doentes apresentam diferentes autoanticorpos que resultam em padrões mistos.

As células Hep-2 constituem um substrato de elevada sensibilidade, que permite, preliminarmente, a avaliação qualitativa (positivo ou negativo), ou semi-quantitativa (positivo com padrão e título associado) que pode ser, posteriormente, identificada e quantificada.

Esta técnica foi realizada em células ANA Hep-2 da DIAMEDIX®

2.2.1.2. Técnica de IFI em tecido triplo de rato

A detecção dos anticorpos é baseada no princípio da IFI em lâminas com cortes de tecidos de estômago, rim e fígado de rato.

Esta combinação de tecidos permite uma ampla pesquisa de anticorpos órgão-específicas, permitindo a detecção de anticorpos: ANA, AMA, AML e anticorpos anti

células parietais-APCA, e também a pesquisa de LKM anticorpos microsossomais de fígado e rim.

Qualquer anticorpo específico presente na amostra do paciente liga-se ao substrato durante a primeira incubação. Após a remoção dos anticorpos não ligados com lavagem, a presença de anticorpos específicos é detectada com o uso do conjugado anti humano IgG durante a segunda incubação.

O conjugado polivalente permite a detecção de anticorpos IgA, IgM e IgG, garantindo uma maior sensibilidade ao teste. O excesso do conjugado FITC é então removido. A formação de um complexo estável do anticorpo fluorescente com o anticorpo humano a qual foi ligado ao antígeno pode ser visualizada com auxílio do microscópio de fluorescência.

Para realizar esta técnica utilizou-se o Kit: CT-3 immunoscreen Fluoro-KitTM da DiaSorin.

2.2.2. Imunoensaio enzimático: ELISA

A técnica de Elisa é um ensaio imunoenzimático para detecção semi-quantitativa de anticorpos IgG. Esta técnica baseia-se na interação antígeno-anticorpo numa placa de superfície inerte com poços onde estão adsorvidos os antígenos de interesse. O soro diluído é adicionado à placa, que se encontra revestida de antígenos. Quando presentes no soro do doente, os anticorpos ligam-se ao antígeno da placa e os restantes são eliminados por lavagem com PBS. Adiciona-se, posteriormente, o conjugado (anti-imunoglobulina humana marcada com peroxidase de rábano). Durante a incubação, as imunoglobulinas ligam-se ao complexo antígeno-anticorpo previamente formado, e as imunoglobulinas não ligadas são eliminadas por lavagem. Com a adição do substrato dá-se uma reação cromogénica, que é parada pela adição de ácido diluído, sendo a intensidade da cor formada proporcional à concentração de anticorpos no soro. A leitura da densidade ótica é efetuada pelo espectrofotometro. Esta técnica foi realizada no MagoPlus da Izoder[®].

2.2.3. Imunoblot

O imunoblot utilizado: kit BlueDot liver da D-tek[®] representado em Portugal pela IZASA[®], permite a determinação qualitativa in vitro de autoanticorpos da classe IgG dirigidos contra cinco antígenos diferentes: AMA-M2, LKM, LC1, SLA/LP e actina-F no soro. O kit é constituído por tiras teste com linhas paralelas de antígenos purificados ou recombinantes. Numa primeira etapa da reação as amostras de soro diluído são incubadas com as tiras de imunoblot. No caso de amostras positivas, os anticorpos ligar-se-ão ao antígeno correspondente. Para detetar os anticorpos ligados é efetuada uma nova incubação com o conjugado enzimático (anti-IgG humana) que, atuando sobre um substrato cromogénio, leva ao desenvolvimento de cor. Os resultados são considerados positivos quando a intensidade de cor é igual ao controlo positivo e considerados negativos quando a intensidade de cor é igual ou inferior ao controlo negativo.

2.3. Determinação de autoanticorpos

2.3.1. Anticorpos antinucleares

Os ANA foram detetados por IFI em células Hep-2 da DIAMEDIX[®], com uma diluição de screening de 1:160 em tampão fosfato (PBS). Utilizou-se o conjugado anti-IgG de cabra marcada com isotiocianato de fluoresceína com 0,001% de corante azul de Evans. Em cada lâmina foi efetuado um controlo positivo e um controlo negativo pertencentes ao Kit.

2.3.2. Anticorpos anti-mitocondriais

Os AMA foram pesquisados em células Hep-2 da DIAMEDIX[®], com uma diluição 1:160 em PBS.

Os anticorpos antimitocondriais tipo M2 foram determinados pelas técnicas de ELISA e imunoblot. A técnica de ELISA utiliza poços revestidos de antígeno constituído por uma mistura de piruvato desidrogenase isolada de células de coração bovino e uma fusão de proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes são produzidas em *E.Coli* e compreendem os domínios imunogénicos das subunidades E2 da cadeia ramificada 2-Oxoácido desidrogenase (BCOADH), piruvato desidrogenase (PDH) e 2-Oxoglutarato desidrogenase (OGDH), juntas denominadas BPO, o conjugado é uma anti-IgG humana de coelho marcada com peroxidase, esta técnica tem como *cut-off* 20 RU/mL. O imunoblot (BlueDOT Liver⁵ IgG da D-tek[®]) deteta autoanticorpos do tipo IgG dirigidos contra M2/PDC nativo (subunidades E1, E2 e E3 do complexo piruvato desidrogenase purificadas de coração bovino) e utiliza como conjugado uma anti-IgG humana de cabra marcada com fosfatase alcalina.

2.3.3. Anticorpos anti-músculo liso

Para pesquisa de anticorpos AML utilizou-se a técnica de IFI em tecido triplo de rato, as amostras foram diluídas em PBS e utilizou-se um conjugado polivalente anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM com FITC da DiaSorin[®], sendo consideradas positivas todas as que apresentam um título superior a 1:40.

2.3.4. Anticorpos anti-LKM

Os anticorpos anti-microsoma de fígado e rim (anti-LKM) foram detetados por IFI e por imunoblot. A deteção por IFI foi efetuada em tecido triplo de rato da DiaSorin[®], utilizando o conjugado polivalente anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM com FITC da DiaSorin sendo consideradas positivas todas as que apresentam um título superior a 1:40. Por imunoblotting (D-tek[®]) foi efetuada a determinação qualitativa dos anticorpos anti-LKM1 da classe IgG utilizando o antígeno recombinante citocromo P450 2D6.

2.3.5. Anticorpos anti-SLA/LP e anti-LC1

Os anticorpos anti-SLA/LP e anti-LC1 foram detetados por IFI em células HEP-2 e por Imunoblot utilizando o kit BlueDOT Liver5 IgG da D-tek[®] que utiliza antígenos recombinantes, para a deteção de anticorpos anti-SLA/LP o Imunoblot utiliza antígeno de fígado solúvel purificado de células de fígado de rato, para a deteção de anticorpos anti-LC1 o imunoblot utiliza ciclodiaminase forminotransferase que é obtida a partir da cultura de células Sf9 infetadas por baculovirus que expressam a forma recombinante humana. A leitura é feita por comparação da intensidade da cor do blot do teste com a intensidade de cor do blot do controlo positivo e negativo.

2.3.6. Anticorpos anti-actina F

Os anticorpos anti-actina F foram detetados por Elisa e por Imunoblot (kit BlueDOT Liver5 IgG da D-tek[®])

Pelo método de Elisa, os anticorpos anti-actina F são detetados pela presença de antígeno F-actina purificado ligado ao poço de poliestireno sob condições que vão preservar o antígeno no seu estado nativo. Por adição de um conjugado IgG anti-humano marcado esta ligação é revelada. A atividade das enzimas é medida após adição de um substrato cromogénico e é proporcional à intensidade de cor que se desenvolve, medida por espectrometria. A leitura é feita por comparação da intensidade de cor desenvolvida nos poços do doente com a cor dos poços de controlo.

Para detetar anticorpos anti-actina F o Imunoblot utiliza como antígeno filamentos de actina polimerizados in-vitro preparados a partir de G-actina purificada de células de músculo esquelético de coelho. A leitura é feita por comparação da intensidade da cor do blot do teste com a intensidade de cor do blot do controlo positivo e negativo.

2.4. Análise estatística

Para análise e tratamento dos resultados irá ser utilizado o programa estatístico *SPSS* e será feita uma análise inferencial aplicando o teste Qui-Quadrado e determinado o coeficiente de contingência ou (c de *Pearson*) para avaliar o tipo de associação existente entre as variáveis nominais para $p < 0,05$.

Capítulo III: Resultados

3. Resultados

A população estudada apresenta idades compreendidas entre os 22 e os 86 anos. A média de idades é de 47 anos e a mediana é de 47 anos, apresentando uma distribuição normal (figura XVI). A população é caracterizada por 9 doentes do sexo masculino e 22 do sexo feminino, o que corresponde a uma percentagem de 71% de mulheres e 19% de homens. Os doentes do sexo feminino têm idades compreendidas entre os 22 e os 86 anos, com uma média de 48 e mediana de 47 anos. No sexo masculino o intervalo de idades é de 23 aos 77 anos, com uma média de 46 e mediana de 44 anos. Em ambos os casos a distribuição é normal (figura XVII).

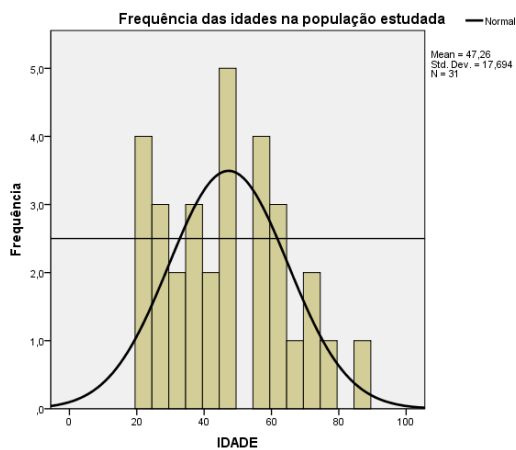


Figura XVI – Histograma de frequência das idades na população estudada.

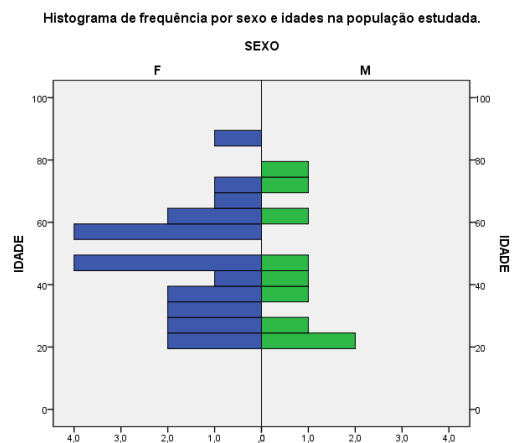


Figura XVII – Histograma de frequência por sexo e idades na população estudada.

Foi observado um claro predomínio de indivíduos do sexo feminino com suspeita de doença hepática autoimune como foi descrito anteriormente por outros autores (Werner *et al* 2008, McFarlane *et al* 2008 e Poupon R. 2010).

3.1. Estudo bioquímico e serológico

Através da consulta do processo clínico foi feito um estudo inicial e individual a todos os doentes com suspeita de doença hepática autoimune de modo a excluir as causas vírica, tóxica ou alcoólica com base no estudo dos parâmetros serológicos e bioquímicos. Com base neste estudo foi determinada a média e o intervalo de valores para cada parâmetro bioquímico que caracteriza a nossa amostra, como está representado na tabela VI.

Tabela VI – Dados bioquímicos e serológicos da população estudada.

	Média	Moda	Intervalo de valores	% De doentes > normal	Intervalo de referência
GGT (UI/L)	209	70	10 – 1430	70	9 – 36
FA (UI/L)	139	124	42 – 535	38	40 – 150
AST (UI/L)	66	39	14 – 373	51	5 – 34
ALT (UI/L)	106	35	11 - 980	38	<55
IgG (mg/dL)	4336	1201	756 – 2910	24	552 – 1631
IgA (mg/dL)	351	269	81 – 1591	16	65 – 421
IgM (mg/dL)	118	102	36 - 278	0	33 - 293

Os valores apresentados representam a média, mediana e intervalo de valores (valor mínimo e valor máximo) nos 31 doentes estudados e intervalo de referência para cada parâmetro bioquímico. GGT - gamaglutamiltransferase, FA - fosfatase alcalina, AST- aspartato aminotransferase, ALT - alanina aminotransferase, IgG - imunoglobulina G, IgA - imunoglobulina A, IgM - imunoglobulina M.

Pela análise da tabela podemos observar que para todos os parâmetros em média os doentes apresentam valores alterados. Quando comparados com os valores de referência temos que 70% dos doentes têm concentração elevada de GGT, 38% têm valores elevados de FA e ALT e 51% com alteração na concentração de AST. Em relação às imunoglobulinas os 31 doentes não apresentam alterações de IgM, 16% têm aumento de IgA e 24% valores elevados de IgG.

Em relação ao estudo serológico, este foi feito igualmente por consulta do processo clínico individual. Todos os doentes apresentavam um resultado negativo para marcadores víricos, o que exclui a causa vírica para a doença Hepática.

3.2. Estudo imunológico (autoanticorpos)

Relativamente aos autoanticorpos determinados pela técnica atual, a frequência dos autoanticorpos dos doentes estudados encontra-se representada na figura XVII. Na tabela VII apresenta-se o número de casos positivos por número de casos estudados e a percentagem de positividade. Para os ANA, apenas 11 doentes dos 31 estudados são positivos, representando uma percentagem de 35,5%. Em relação aos ANCA, anti-LKM1, anti-LC1 e anti-SLA não foram encontrados casos positivos. Os AML apresentam-se positivos em 16,1% (5 positivos em 31 doentes). Relativamente aos anticorpos anti-M2 e anti-actina F, ambos apresentam positividade em 3 casos correspondendo a uma percentagem de 9,7.

Figura XVII – Frequência dos vários autoanticorpos na população estudada.

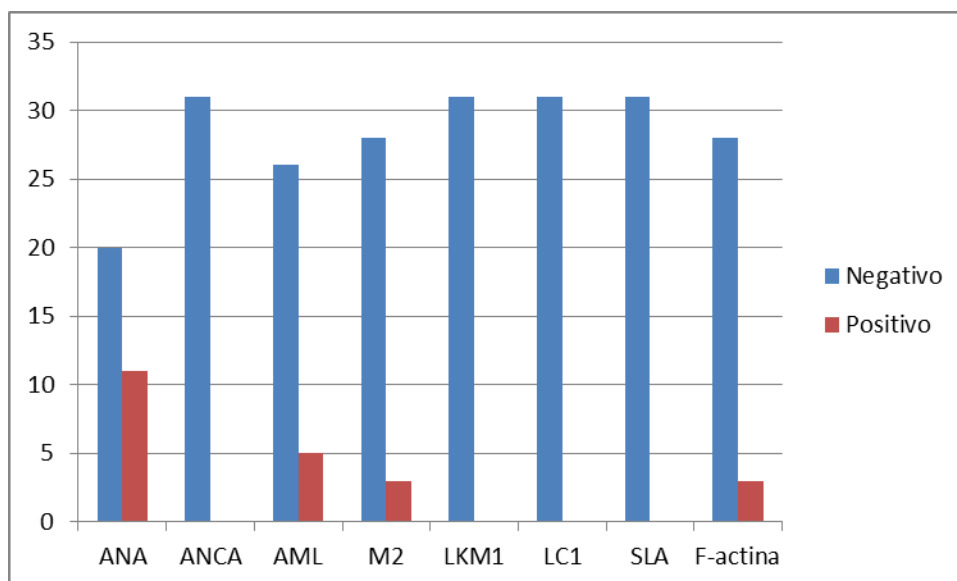
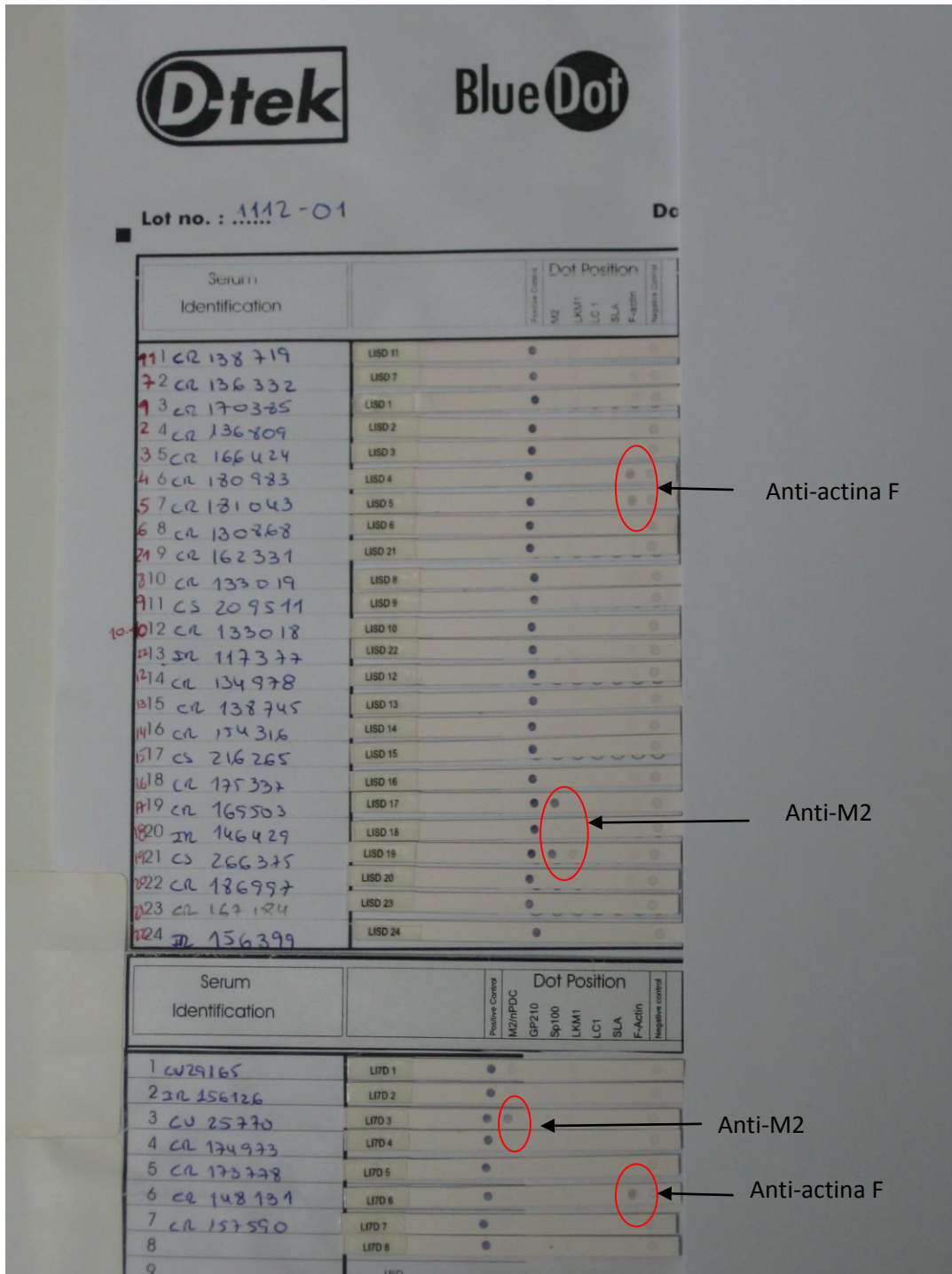


Tabela VII – Percentagem de casos positivos por casos estudados.

	ANA	ANCA	AML	M2	LKM1	LC1	SLA	F-actina
Pos/Total	11/31	0/31	5/31	3/31	0/31	0/31	0/31	3/31
% de Pos	35,5	0	16,1	9,7	0	0	0	9,7

Na figura XVIII encontram-se os resultados referentes aos imunoblots realizados às 31 amostras utilizando o kit em estudo BlueDot liver da D-tek[®]. Pela análise dos resultados podemos observar que dos 31 doentes apenas 3 apresentam anticorpos anti-M2 positivos e 3 doentes anticorpos anti-actina F positivos.

Figura XVIII – Imagem dos imunoblots realizados às 31 amostras.



Os três doentes que apresentam positividade para os anticorpos anti-actina F encontram-se especificados na tabela VIII, e relativamente a estes podemos verificar que apresentam ANA com títulos de 1:160, 1:640 e 1:160 respetivamente, e AML negativos. Estes resultados são compatíveis com uma suspeita de HAI tipo 1, que é caracterizada pela presença de ANA, AML ou ambos (Manns *et al* 2009; Vergani *et al* 2009).

Tabela VIII – Caracterização bioquímica e serológica dos três casos com pesquisa de anticorpos anti-actina F positiva.

	Idade	Sexo	ANA	AML	Anti-actina F	AST	ALT	IgG
1º caso	28	F	1:160	Negativo	Positivo	40	60	1700
2º caso	69	F	1:640	Negativo	Positivo	137	158	2602
3º caso	58	F	1:160	Negativo	Positivo	373	980	1903

Valores de referência: AST (5-34) UI/L; ALT (<55)UI/L; IgG (552-1631) mg/dL; ANA determinada por IFI é positivo para títulos ≥ 160 .

Na HAI tipo 1 os doentes apresentam níveis serológicos de enzimas hepáticas AST e ALT elevados e níveis de IgG altos (Manns *et al* 2009; Vergani *et al* 2009), e pela observação da tabela VIII, todos os casos são caracterizados por alteração destes parâmetros bioquímicos

As mulheres constituem pelo menos 70% dos casos de HAI, e destes, 50% têm idade inferior a 40 anos. No entanto, a idade do aparecimento da doença pode variar desde a infância até à terceira idade (Manns *et al* 2010). Embora mais frequente na população jovem, os nossos casos de suspeita de HAI tipo1 são constituídos por mulheres de 28, 58 e 69 anos respetivamente.

A HAI é uma doença rara, mas, uma vez que não fizemos um estudo à população em geral, não podemos concluir em relação à prevalência e incidência na nossa população. Contudo, podemos referir, que dos 81 doentes que inicialmente foram identificados com diagnóstico de suspeita de doença hepática autoimune, só 31 é que foram selecionados após exclusão de causa vírica, alcoólica ou tóxica, e destes só 3 é que apresentam um perfil bioquímico e serológico compatível com uma possível HAI tipo 1 caracterizada pela presença de autoanticorpos anti-actina F.

Para chegar a um diagnóstico definitivo é aplicado um sistema de pontuação simplificada desenvolvida por Hemes e colaboradores, baseado em apenas quatro parâmetros, nomeadamente, a histologia hepática, o título de autoanticorpos, os níveis de IgG e a ausência de marcadores de hepatites víricas, na tabela IX está representada a pontuação atribuída aos 3 casos de suspeita de HAI tipo 1.

Tabela IX – Sistema de pontuação simplificada do Grupo Internacional da HAI aplicada aos três casos de suspeita de HAI tipo 1.

	Caso 1	Caso 2	Caso 3
ANA ou AML $\geq 1:80$	+2	+2	+2
Níveis de IgG	+1	+2	+2
Dados histológicos	+2	?	?
Ausência de hepatite vírica	+2	+2	+2
Pontuação pré-tratamento	7	Pelo menos 6 pontos	Pelo menos 6 pontos

Diagnóstico provável ≥ 6 ; Diagnóstico definitivo ≥ 7 ; ANA ou AML $\geq 1:80$ (2 pontos); IgG > limite superior normal (1 ponto), IgG > 1,10 limite superior normal (2 pontos); Dados histológicos: Morfologia compatível com HAI (1 Ponto), Morfologia típica de HAI (2 Pontos).

Por observação da pontuação obtida para cada um dos casos podemos concluir no 1º caso, com uma pontuação de 7, estamos perante um diagnóstico definitivo de HAI. Nos restantes casos, não foi possível obter informação da histologia hepática uma vez que na altura da recolha de dados esta ainda não tinha sido requisitada ao serviço de Anatomia Patológica, logo, não podemos obter a pontuação definitiva, mas podemos estimar que estes dois doentes obteram pelo menos 6 pontos, o que já corresponde a um diagnóstico provável de HAI.

Neste estudo não encontramos nenhum doente com HAI tipo 2, ou seja, não obtivemos resultados positivos para os autoanticorpos anti-LKM1 e anti-LC1, quando testamos o nosso painel de autoanticorpos. Isto pode dever-se ao fato de este tipo de HAI afetar mais as crianças, que não fazem parte do universo de utentes do Hospital Pedro Hispano-ULSM, sendo referenciadas para hospitais especializados em patologias de crianças.

Como está apresentado na tabela VII, também foram identificados 3 casos de presença de autoanticorpos anti-mitochondriais M2 positivos, e em relação aos dados bioquímicos e serológicos estes estão apresentados na tabela X.

Tabela X – Caracterização bioquímica e serológica dos três casos com pesquisa de anticorpos anti-mitochondriais M2 positiva.

	Idade	Sexo	ANA	M2	GGT	FA	AST	ALT
1º caso	33	F	Negativo	Positivo	38	152	35	63
2º caso	47	F	Negativo	Positivo	53	163	40	56
3º caso	49	F	Negativo	Positivo	56	176	70	60

Valores de referência: GGT (9-36) UI/l; FA (40-150) UI/l; AST (5-34) UI/l; ALT (<55)UI/l

Por observação da tabela X, podemos observar que estamos perante três doentes do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 33 e os 49 anos, podendo estes ser

considerados como apresentação precoce da doença, uma vez que a CBP afeta predominantemente mulheres com idade superior a 40 anos (Poupon R. 2010).

Estes três casos caracterizam-se por alterações do padrão de enzimas colestático, com elevação da FA e da GGT, e associadamente uma elevação mínima ou moderada das transaminases. Os resultados encontrados estão concordantes com as alterações analíticas descritas por Heathcole em 2000 e por Poupon R. em 2010.

Os anticorpos anti-mitocondriais, considerados marcadores imunológicos específicos para o diagnóstico da CBP (Lleo *et al* 2008), são positivos nestes três doentes. Desta forma podemos considerar que este perfil é compatível com o diagnóstico de CBP. Os ANA apresentam-se negativos mas, nesta patologia estes autoanticorpos relacionam-se com a gravidade e progressão da doença (Lleo *et al* 2008), podendo assim considerar-se que estamos perante casos de apresentação menos grave da doença.

Relativamente ao exame histológico destes 3 doentes, e após consulta do processo clínico, verificamos que este não foi requisitado ao serviço de Anatomia Patológica. A biópsia hepática é considerada imperativa apenas nos casos de negatividade dos AMA, bioquímica atípica ou suspeita de associação com outra causa de doença hepática (Pinho *et al* 2012), o que não acontece nestes casos em que temos presença de AMA e uma bioquímica característica de CBP. Ainda assim é importante referir que a histologia tem valor prognóstico e auxilia decisões terapêuticas (Poupon 2010).

3.3. Comparação de métodos

Os resultados dos anticorpos anti-M2 e anti-actina F determinados por Elisa, na metodologia atual e Imunoblot, na metodologia em estudo e os anticorpos anti-SLA, anti-LKM1 e anti-LC1 determinados por IFI (metodologia atual) e Imunoblot (metodologia em estudo) foram correlacionados recorrendo a análise inferencial aplicando o teste Qui-Quadrado onde foi determinado o coeficiente de contingência ou (c de *Pearson*) para avaliar o grau de associação existente entre as duas variáveis nominais. Para cada grupo de técnicas comparadas utilizaram-se tabelas de contingência de dupla entrada e calculou-se o coeficiente de *Pearson*.

Pela análise da tabela de contingência de dupla entrada apresentada na tabela XI podemos observar que, dos 31 doentes estudados apenas 3 tinham anticorpos anti-mitocondriais positivos, que foram determinados positivos pelas duas técnicas, pelo que apresentam um coeficiente de correlação de *Pearson* de 1, que exprime uma forte relação linear entre as variáveis.

Tabela XI – Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-mitocondriais M2 determinados pelas técnicas de ELISA (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Anticorpos anti-mitocôndriais M2

		Imunoblot		Total
		POSITIVO	NEGATIVO	
ELISA	POSITIVO	3	0	3
	NEGATIVO	0	28	28
Total		3	28	31

Coeficiente de correlação de *Pearson* = 1

Em relação aos anticorpos anti-LKM todos os resultados foram negativos pela técnica de IFI e também por Imunoblot, como podemos verificar pela análise da tabela XII.

Como o coeficiente de correlação de *Pearson* é igual a 1, significa que existe uma forte e positiva relação entre as variáveis e uma concordância de 100%.

Tabela XII- Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-LKM1 determinados pelas técnicas de IFI em tecido triplo de rato (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Anticorpos anti-LKM1

		Imunoblot		
		POSITIVO	NEGATIVO	Total
IFI	POSITIVO	0	0	0
	NEGATIVO	0	31	31
Total		0	31	31

Coefficiente de correlação de *Pearson* = 1

Quando submetemos os resultados dos anticorpos anti-LC1 determinados pelas duas técnicas à análise inferencial com aplicação do teste do Qui-Quadrado (tabela XIII), observamos que os 31 doentes têm autoanticorpos negativos pelos dois métodos, logo com um coeficiente de correlação de *Pearson* de 1 existe uma forte e positiva relação entre as variáveis e 100% de concordância.

Tabela XIII- Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-LC1 determinados pelas técnicas de IFI em células HEP-2 (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Anticorpos anti-LC1

		Imunoblot		
		POSITIVO	NEGATIVO	Total
IFI	POSITIVO	0	0	0
	NEGATIVO	0	31	31
Total		0	31	31

Coefficiente de correlação de *Pearson* = 1

Pela análise inferencial aos resultados dos anticorpos anti-SLA aplicando o teste do Qui-quadrado (tabela XIV), observamos que todos os doentes apresentam os autoanticorpos negativos pelos dois métodos e que o Coeficiente de correlação de *Pearson* é de 1 pelo que existe uma forte relação entre as variáveis ou seja 100% de concordância.

Tabela XIV - Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-SLA determinados pelas técnicas de IFI em células HEP-2 (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

Anticorpos anti-SLA

		Imunoblot		Total
		POSITIVO	NEGATIVO	
IFI	POSITIVO	0	0	0
	NEGATIVO	0	31	31
Total		0	31	31

Coeficiente de correlação de *Pearson* = 1

Em relação aos anticorpos anti-actina F, apenas 3 doentes apresentam estes auto-anticorpos positivos e que foram confirmados pelos dois métodos como se verifica pela aplicação do teste do Qui-Quadrado (tabela XV). O Coeficiente de correlação de *Pearson* encontrado foi 1 pelo que se verifica uma associação linear entre as variáveis com 100% de concordância.

Tabela XV - Tabela de contingência de dupla entrada para os anticorpos anti-actina F determinados pelas técnicas de ELISA (técnica atual) e Imunoblot (técnica em estudo).

		Anticorpos anti-actina F		
		Imunoblot		Total
		POSITIVO	NEGATIVO	
ELISA	POSITIVO	3	0	3
	NEGATIVO	0	28	28
Total		3	28	31

Coeficiente de correlação de *Pearson* = 1

3.4. Avaliação custo/benefício

Para efetuar uma correta comparação dos custos efetivos da determinação dos autoanticorpos pelos métodos utilizados na rotina laboratorial e pelo método em estudo, foi necessário calcular o valor teste para cada determinação, tendo em conta o preço do kit, o número de testes que ele possibilita realizar e o número de testes que gasta em controles e calibradores por ensaio. Para os testes realizados em laboratório no exterior (anticorpos anti-SLA, anti-LC1 e anti-actina F) o preço cobrado ao laboratório está especificado na Portaria nº 839 – A/2009 publicada no Diário da República, 1ª série – nº 147 de 31 de Julho de 2009, e é acrescido de um desconto de 20%.

Sendo assim, o somatório do preço dos testes de pesquisa de autoanticorpos realizados na rotina laboratorial e no laboratório externo, corresponde ao gasto atual para a determinação do painel de anticorpos na suspeita de doença hepática autoimune e encontra-se representado na tabela XVI.

Tabela XVI - Tabela representativa do valor/teste de cada autoanticorpo realizado na rotina laboratorial pelas técnicas atuais.

Autoanticorpos	Preço em euros / teste
Anti-M2	8,88
Anti-LKM1	7,38
Anti- LC1*	8,56
Anti-SLA*	8,56
Anti-actina F*	13,36
Total	46,74

*Análises realizadas em laboratório externo.

Tabela XVII - Tabela representativa do valor/teste do painel de autoanticorpos (anti-M2, anti-LKM1, anti-LC1, anti-SLA e anti-actina F) determinados pela técnica em estudo.

Custo do kit de Imunoblot BlueDot liver da D-tek®.	
Kit de 24 testes	553,50 €*
Preço / Teste	23,06 €

*Valor fornecido pela casa comercial IZASA®.

Pela análise da tabela XVI podemos verificar que o preço atual relativo ao painel de autoanticorpos para diagnóstico de doença hepática autoimune é de 46,74 euros e que corresponde ao somatório do preço individual dos autoanticorpos pesquisados na nossa rotina laboratorial (anti-M2 e anti-LKM1) e no laboratório externo (anti-LC1, anti-SLA e

anti-actina F). Na tabela XVII está representado o preço do Imunoblot, que inclui a pesquisa de todos os autoanticorpos do painel acima referido e que é de 23,06 euros.

Após esta análise podemos observar que a escolha da realização deste painel de autoanticorpos pela nova metodologia representa uma poupança de 23,68 euros (46,74€-23,06€), ou seja 51%, tendo ainda como vantagem a realização desta análise diariamente, não sendo necessário a acumulação de amostras para a realização de um ensaio, de forma a rentabilizar os controlos e calibradores (como acontece nas técnicas de ELISA e IFI), uma vez que na técnica de imunoblot os controlos são intra-teste.

A vantagem da realização desta técnica diariamente, é que promove uma resposta rápida e eficiente do laboratório, antecipando desta forma o diagnóstico da doença hepática autoimune e o início rápido do tratamento em benefício do doente, a um custo inferior correspondente a uma poupança de 51%.

Capítulo IV:

Discussão e Conclusão

4. Discussão e Conclusão

O diagnóstico atempado de uma HAI revela-se de grande importância uma vez que os doentes têm uma resposta muito favorável à terapêutica anti-inflamatória e imunossupressora. Esta terapêutica agrava outro tipo de patologias como é o caso da hepatite C, devido às suas semelhanças clínicas e expressão de alguns autoanticorpos marcadores da HAI. Deste modo, um correto diagnóstico é fundamental no estudo destas doenças (Zachou *et al.* 2004). O diagnóstico das doenças hepáticas autoimunes é efetuado recorrendo à deteção dos autoanticorpos, que são uma ferramenta importante na atividade da doença. O perfil e a ordem da pesquisa de autoanticorpos é de extrema importância para a avaliação da doença hepática de causa desconhecida (Dalekos *et al.* 2002; Zachau *et al.* 2004).

Aos doentes com alterações bioquímicas, clínicas e/ou histológicas sugestivas de doença hepática autoimune, deve ser efetuada de forma sistemática a pesquisa de autoanticorpos ANA, AML, anti-LKM1, AMA e p-ANCA, uma vez que estes autoanticorpos fazem parte do sistema de pontuação do IAIHG para o diagnóstico da HAI. O diagnóstico ou exclusão de doença hepática autoimune não podem ser baseados no simples fato destes autoanticorpos estarem ou não presentes, e a sua repetição deve ser efetuada sempre que a clínica o justifique.

A nossa amostra foi caracterizada por um claro predomínio de indivíduos do sexo feminino (71%) com suspeita de doença hepática autoimune, o que está de acordo com o que foi descrito por outros autores.

Todos os doentes incluídos no estudo apresentavam em média valores aumentados das enzimas características da função hepática, nomeadamente a GGT, FA, AST e ALT, em relação às imunoglobulinas, só para a IgG é que em média apresentam valores aumentados, isso devendo-se ao fato de estarem numa fase inicial de estudo e estadiamento da doença, com ausência de terapêutica instituída.

No nosso estudo, dos 31 doentes com diagnóstico de suspeita de doença hepática autoimune, 11 têm pesquisa de ANA positivo (35,5%), 3 têm AMA positivo (9,7%) e 3 têm anticorpos anti-actina F positivos (9,7%). Pela análise destes resultados podemos concluir que os ANA são autoanticorpos com alta sensibilidade mas de baixa

especificidade como está descrito por alguns autores (Dalekos *et al.* 2002; Czaja e Norman 2003; Zachau *et al.* 2004; Bogdanos *et al.* 2008).

Dos três doentes do sexo feminino com pesquisa de anticorpos anti-actina F positiva, apesar de só um ter idade inferior a 40 anos, quando se aplica o sistema de pontuação simplificada do IAIHG, conclui-se que têm como diagnóstico definitivo uma HAI tipo 1.

Em relação aos doentes com pesquisa de anticorpos anti-mitocondriais positiva, mesmo sem dados sobre o estudo histológico, é possível estabelecer um diagnóstico definitivo, apoiado na presença de dois critérios, a alteração do padrão de enzimas colestáticas e a presença do anticorpo específico anti-M2. A ausência de ANA nestes doentes indica que estamos perante uma apresentação menos grave da CBP.

Os resultados relativos à pesquisa dos autoanticorpos (M2, LKM1, LC1, SLA e actina F) realizada por pedido, em requisição ao exterior foram comparados com a técnica de imunoblot do Kit BlueDot liver da D-tek[®]. Os resultados encontrados foram de 100% de concordância entre os métodos de IFI e imunoblot e ELISA e imunoblot.

Os procedimentos de IFI para a deteção de autoanticorpos embora mais sensíveis, são subjetivos, com o desempenho do ensaio a depender do tipo de tecido usado, da especificidade do conjugado, da potência do sistema microscópico usado para ler o resultado, assim como da experiência do observador. Os novos métodos ELISA e Imunoblot têm um potencial superior assim como um desempenho mais padronizado e autónomo, revelando-se mais específicos que os métodos de IFI.

Por outro lado quando analisamos a relação custo/benefício, podemos concluir que seria uma boa estratégia a implementação da técnica de Imunoblot na rotina laboratorial, uma vez que proporciona uma rápida disponibilização dos resultados para o clínico, antecipando desta forma o diagnóstico e o início rápido do tratamento em benefício do doente, a um preço 51% inferior ao que é praticado atualmente, uma vez que o laboratório dispõe de capacidade técnica e tempo para a sua execução.

Em síntese, este trabalho demonstra a grande utilidade da pesquisa destes autoanticorpos para o diagnóstico das doenças hepáticas e a importância da introdução destes testes na rotina laboratorial. No entanto, uma das grandes limitações deste estudo foi o tamanho da amostra e o fato de estar limitado aos pedidos feitos pelos clínicos e pela

informação clínica por vezes incompleta nos processos clínicos. Futuramente, este trabalho pode ser complementado com o aumento do número de doentes, inclusão de doentes com outras patologias, e ainda de um grupo controlo (indivíduos saudáveis).

Capítulo V:

Perspetivas futuras

5. Perspetivas futuras

Os testes serológicos têm provado ser um instrumento imprescindível no diagnóstico laboratorial da HAI e da CBP, mas no caso da CEP ainda não foi identificado um marcador bioquímico relevante da doença. O objetivo de uma identificação mais precisa, com marcadores mais sensíveis e específicos para cada uma das doenças autoimunes hepáticas e síndromes de sobreposição justificam um esforço contínuo nesta área de diagnóstico. O sucesso num futuro próximo requererá uma melhor caracterização molecular dos determinantes autoantigénicos e melhor padronização entre laboratórios. No entanto, os avanços na tecnologia permitem atualmente um maior desenvolvimento na automatização nos métodos de deteção, associado-lhes uma maior rapidez, precisão e fiabilidade. Deve no entanto continuar a investigação de novos marcadores serológicos da doença hepática autoimune, que podem ter não só uma maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico mas também ter grande relevância para a patogénese quando comparados com os marcadores tradicionais usados na rotina laboratorial. Com o objetivo final de prever e possivelmente prevenir a autoimunidade será de grande importância ter acesso ao papel preditivo dos autoanticorpos específicos da doença hepática autoimune, e a possibilidade de uma investigação de elevado rendimento de múltiplos autoantigénios reativos irá permitir um rastreio de uma população saudável para um potencial autoimune. Finalmente, a presença de autoanticorpos num indivíduo saudável não só pode prever o desenvolvimento de uma doença hepática autoimune específica, como também predizer quais as manifestações clínicas, gravidade e grau de progressão da doença.

Como perspetiva futura na nossa rotina laboratorial seria uma mais valia a introdução de um Kit de imunoblot que permite a pesquisa de anti-gp210 e anti-Sp100, e permite aumentar a sensibilidade diagnóstica de doentes com CBP, permitindo um diagnóstico e tratamento mais precoces (Invernizzi *et al.* 2007).

Atualmente está em investigação e desenvolvimento a tecnologia de microarrays de proteínas, cujos resultados apontam para que a curto prazo a identificação de novos biomarcadores úteis para o diagnóstico e prognóstico das doenças autoimunes seja uma realidade (Song Q. *et al.* 2010).

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Alvarez, F., Berg, P. A., Bianchi, F.B., Bianchi, L., Burroughs, A.K., Cancado, EL., Chapman, R.W., Cooksley, W.G., Czaja, A.J., Desmet, V.J., Donaldson, P.T., Eddleston, A.L., Fainboim, L., Heathcote, J., Homberg, J.C., Hoofnagle, J.H., Kakumu, S., Krawitt, E.L., Mackay, I.R., MacSween, R.N., Maddrey, W.C., Manns, M.P., McFarlane, I.G., Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya, M.(1999). International Autoimmune Hepatitis Group Report. Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 31(5), 929-938.
- Amberg, S. (1942). Hyperproteinemia associated with severe liver damage. *Mayo Clinic Proceedings* 17, 360-362.
- Aubert, V., Pislser, I. G. Spertini, F. (2008). Improved diagnoses of autoimmune hepatitis using an anti-actin ELISA. *J Clin Laboratory Analysis* 22(5), 340-345.
- Baeares, M., Herkel, J., Czaja, A.J., Wies, I., Kanzler, S., Cancado, E.L., Porta, G., Nishioka, M., Simon, T., Daehnrich, C., Schlumberger, W., Galle, P.R., Lohse, A.W. (2002). Establishmrent of standardized SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut*, 51(2), 259-264.
- Beuers, U. (2005). Hepatic overlap syndromes. *J Hepatol*, 42 sup (1), S93-S99.
- Bogdanos, D.P., Gilbert, D., Bianchi, I., Leoni, S., Mitry, R. R., Ma, Y., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. (2004). Antibodies to soluble liver antigen and alphaenolase in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmune Dis*, 1(1), 4.
- Bogdanos, D.P., Invernizzi, P., Mackay, I. R., Vergani, D. (2008). Autoimmune liver serology, *Current diagnostic and clinical challenges. World J Gastroentero*, 14(21), 3374-3387.
- Cassani, F., Cataleta, M., Valentini, P. Muratori, P., Giostra, F., Francesconi, R. (1997). Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparation with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 26(3), 561-566.
- Corpechot C, Chrétien Y, Chazouillères O, Poupon R.(2010). Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis. *J Hepatology* 53(1), 162-169.
- Choi, G., Peters, M. G. (2008). The challenge of diagnosing autoimmune hepatitis: less is more. *Hepatology*. 48(1), 10-12.
- Chowdhary, V. R., Crowson, C. S., Poterucha, J. J., Moder, K. J. (2008). Liver involvement in systemic lupus erythematous: case review of 40 patients. *Journal of Rheumatology* 35(11), 2159-2164.
- Chung, H., Waternabe, T., Kudo, M., Maenishi, O., Wakatsuki, Y., Chiba, T. (2010). Identification and characterization of IgG4-associated autoimmune hepatitis. *Liver International* 30(2), 222-231,

- Crosignani, A., Battezzati, P. M., Invernizzi, P., Selmi, C., Prina, E., Podda, M. (2008). Clinical features and management of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 14(21), 3313-3327.
- Czaja, A. J. (1996). The Variant Forms of Autoimmune Hepatitis. *Annals of Internal Medicine* 125, 588-598,
- Czaja, A. J. (1999). Variant forms of autoimmune hepatitis. *Current Gastroenterology Reports* 1(1), 63-70.
- Czaja, A. J. (2005). Current concepts in autoimmune hepatitis. *Ann Hepatol*, 4(1), 6-24.
- Czaja, A. J. (2007). Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 23(3), 255-262.
- Czaja, A. J. (2008). Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 24(3), 298-305.
- Czaja, A. J. (2008). Performance parameters of the diagnostic scoring systems for autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 48(5), 1540-1548.
- Czaja, A. J. (2009). Features and consequences of untreated type 1 autoimmune hepatitis. *Liver International* 29(6), 816-823.
- Czaja, A. J. (2010). Autoantibodies as prognostic markers in autoimmune liver disease. *Digestive Diseases and Sciences* 55(8), 2144-2161.
- Czaja, A. J., Cassani, F., Cataleta M, Valentini, P., Bianchi, F.B. (1997), Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci*, 42(8), 1688-1696.
- Czaja, A. J., Freese, D, K. (2002). Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 36(2), 479-497.
- Czaja, A. J. Norman, G. L. (2003). Autoantibodies in the diagnosis and management of liver disease. *J Clin Gastroenterol*, 37 (4), 315-329.
- Dalekos, G. N., Zachou, K., Liaskos, C., Gatselis, N. (2002). Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med*, 13(5), 293-303.
- Duarte, A. (2005). Antinuclear factor in dermatology. *An. Bras. Dermatol.*, 80(4), 387-394.
- EASL (2009). Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *JHepatology* 51, 237-267.
- Feld, J. J., Dinh, H., Arenovich, T., Marcus, V. A., Wanless, I. R., Heathcote, E. J. (2005). Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology* 42(1), 53-62.
- Giorgini, A., Selmi, C., Invernizzi, P., Podda, M. U., Zuin, M. S., Gershwin, M.E. (2005). Primary biliary cirrhosis: solving the enigma. *Ann N Y Acad Sci*, 1051, 185-193.
- Granito, A, Muratori, P Muratori, Pappas, G., Guidi, M., Cassani, F., Volta, U. Ferri, A., Lenzi, M., Bianchi, F. B.(2006). Antibodies to filamentous actin (F-actin) in type 1 autoimmune hepatitis. *J Clin Pathol* 59(3), 280-284.

- Heathcote, E. J. (2000). Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the study of liver diseases practice guidelines. *Hepatology* 31(4), 1005-1013.
- Hennes, E. M., Zeniya, M., Czaja, A. J., Parés, A., Dalekos, G. N., Krawitt, E. L. (2008). Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 48(1), 169-176.
- Homborg, J. C. Abuaf, N. Bernard, O., Islam, S., Alvarez, F., Khalil, SH., Poupon, R., Darnis, F., Lévy, VG., Grippon, P. (1987). Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidneymicrosome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 7(6), 1333-1339.
- Invernizzi, P., Lleo, A., Podda, M. (2007). Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis* 27(2), 161-172.
- Invernizzi, P., Selmi, C. Ranftler, C., Podda, M., Wesierska-Gadek, J. (2005). Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 25(3), 298-310.
- Jaskowski, T. D., Konnick, E. Q., Ashwood, E. R., Litwin, C. M., Hill, H.R. (2007). Prevalence of IgG autoantibody against F-actin in patients suspected of having autoimmune or occult hepatitis. *J Clin Lab Anal* 21(4), 249-253.
- Johnson, P.J., Mcfarlane, I. G. (1993). Meeting report: International Autoimmune Hepatitis group. *Hepatology* 18(4), 998-1005.
- Jones, D. E. (2000). Autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol* 53(11), 813-821.
- Kammer, A. R., Van Der Burg, S. H., Valentini, P., Grabscheid, B., Hunziker, a, I. P., Kwappenberg, M.C., Reichen, J., Melief, J.M., and Cernya, A. (1999). Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J of Experimental Medicine* 190(2), 169-176.
- Kanzler, S, Weidemann, C., Gerken, G., Lohr, H. F., Galle, P. R., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Lohse, A. W. (1999). Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 31(4), 635-640.
- Krawitt EL. (1996). Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 334, 897-903.
- Krawitt, E. L. (2006). Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 354(1), 54-66.
- Krawitt, E. L. (2008). Clinical features and management of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 14(21), 3301-3305.
- KRAWITT, Eduard, L. (1996). Autoimmune Hepatitis, Review Article. *The New England Journal of Medicine* 334(14), 897-903,
- Kunkel, H. G., Eisenmenger A. E., Bougovanni, A. M., Slater, R. J. (1951). Extreme hypergammaglobulinemia in young women with liver disease of unknown etiology. *J Clin Investigation* 30, 654-659.
- Leber, W. J. (1950). Blutproteine und Nahrungseiweisse. *Dtsch Gesellsch Verd Stoff* (15), 113-119.

- Lenzi, M., Montovani, W., Cataleta, M. (1992). FILA typing in autoimmune hepatitis (AI CAH) Type 2. *J Hepatol* 16, 59.
- Lindgren, S., Nilsson, S., Nässberger, L., Verbaan, H., Wieslander, J. (2000). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with chronic liver diseases: prevalence, antigen specificity and predictive value for diagnosis of autoimmune liver disease. Swedish Internal Medicine Liver Club (SILK). *J Gastroenterol Hepatol* 15(4), 437-442.
- Liver Autoantibodies (2012). University of Birmingham. <http://www.birmingham.ac.uk>.
- Lleo, A., Invernizzi, P., Mackay, I. R., Prince, H., Zhong, R.Q., Gershwin, M. E. (2008). Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 14(21), 3328-3337.
- Luxon, B. A. (2003). Autoimmune hepatitis. Making sense of all those antibodies. *Postgrad Med* 114(1), 79-82, 85-88.
- Mackay, I., Taft, L.I., Cowling, D. C. (1956). Lupoid Hepatitis. *The Lancet* 268, (6957), 1323-1326.,
- Manns, M. P., Czaja, A. J., Gorham, J. D. Krawitt, E.L., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., Vierling, J.M. (2010). Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51(6), 2193-2213.
- Manns, M. P., Vogel, A. (2006). Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 43(2), S132-144.
- Manns, M. P., Vergani, D. (2009). Autoimmune hepatitis. *Seminars in Liver Disease* 29(3), 239-240.
- Martini, E., Abauf, N., Cavaliu, F., Durand, V., Johanet, C., Homberg, J. C. (1988). Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 8(6), 1662-1666.
- McFarlane, I. G. (2001). Autoimmune liver diseases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 235, 53-60.
- Muratori, P., Muratori L., Ferrari, R., Cessani, F., Bianchi, G., Lenzi, M., Rodrigo, L., Linares, A., Fuentes, D., Bianchi, F. B. (2003). Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 98 (2), 431-437.
- Orts Costa JA, Z. C., Alarcón Torres I (2004). Hepatitis autoimune. *An Med Interna (Madrid)* (21), 340-354.
- Poupon, R. (2010). Primary Biliary Cirrhosis. *J Hepatology* 5, 745-758.
- Rodrigues, F., Cunha, R. (2012). Doenças Autoimunes. Atlas de Imunofluorescência. <http://chobela.blogspot.pt>.
- Rigopoulou, E. I., Davies E. T., Pares, A., Zachou, K., Liaskos, C. (2005). Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 54 (4), 528-532.

- Rigopoulou, E. I., Mytilinaiou, M., Romanidou, O., Liaskos, C., Dalekos G. N. (2007). Autoimmune hepatitis-specific antibodies against soluble liver antigen and liver cytosol type 1 in patients with chronic viral hepatitis. *J Autoimmune Dis* 4, 2.
- Selmi, C., Invernizzi, P., Mackay, I. R., Keefe, Emmet B., Coppel, R. L., Podda, M., Rossaro, L., Ansari, A. A., Gershwin, M. E. (2004). Epidemiology and pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 38(3), 364-371.
- Song Q., Liu G., Hu S., Zhang Y., Tao Y., Han Y., Zeng H., Huang W., Li F., Chen P., Zhu J., Hu C., Zhang S., Li Y., Zhu H., Wu L.(2010). Novel autoimmune hepatitis-specific autoantigens identified using protein microarray technology. *J. Proteome Res* 9 (1), 30-39.
- Terjung, B., Spengler, U., Sauerbruch, T., Worman, H. J. (2000). Atypical p-ANCA in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50 Kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 11(2), 310-322.
- Terjung, B., Worman, H. J. (2001). Anti-neutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15 (4), 629-642.
- Vaio, T, (2008). Hepatite auto-imune casuistica de um serviço de Medicina Interna. *Artigos originais de Medicina Interna* 15 (2), 6.
- Vergani, D, Longhi, M. S., Bogdanos, D. P., Ma, Y., Mieli-Vergani, G. (2009). Autoimmune hepatitis. *Seminars in Immunopathology* 31(3), 421-435.
- Vergani, D., Mieli-Vergani, G. (2003). Autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2(5), 241-247.
- Vergani, D., Mieli-Vergani, G. (2008). Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 14(21), 3306-3312.
- Villalta, D., Bizzaro, N., Da Re, M., Tozzoli, R., Komorowski, L. and Tonutti, E. (2008). Diagnostic accuracy of four different immunological methods for the detection of anti-F-actin autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis and other liver-related disorders. *Autoimmunity* 41(1), 105-110.
- Washington, M. K. (2007). Autoimmune liver disease: overlap and outliers. *Mod Pathol* 20 Suppl 1, S15-30.
- Werner, M., Prytz, H., Ohlsson, B., Almer, S., Björnsson, E., Bergquist, A., Wallerstedt, S., Sandberg-Gertzén, H., Hultcrantz, R., Sangfelt, P., Weiland, O., Danielsson, A. (2008). Epidemiology and the initial presentation of autoimmune hepatitis in Sweden: a nationwide study. *Scandinavian Journal of gastroenterology* 43(10), 1232-1240.
- Wesierska-Gadek, J., Penner, E. Battezzati, P.M., Selmi, C., Zuin, M., Hitchman, E., Worman, H. J., Gershwin, M. E., Podda, M. and Invernizzi, P. (2006). Correlation of initial autoantibody profile and clinical outcome in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 43(5), 1135-1144

Wies, I., Brunner, Henninger, J., Herkel, J., Kanzler, S., Meyer Zum Meyer zum Büschenfelde, K.H., Lohse, A.W. (2000). Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 355(9214), 1510-1515.

Wiik, A., Høier-Madsen, M., Forslid, J., Charles, P., Meyrowitsch, J. (2010). Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *Journal of Autoimmunity* 35(3), 276-290.

Zechou, K., Rigopoulou, E. and Dalekos, G. (2004). Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 1(1), 1-17.

