



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA  
POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA SEPTAL E PERISSEPTAL  
NA CIRROSE SECUNDÁRIA À HEPATOPATIA  
ALCOÓLICA.**

**Tese de Doutorado**

Carlos Thadeu Schmidt Cerski

Porto Alegre  
15 de dezembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA  
POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA SEPTAL E PERISSEPTAL  
NA CIRROSE SECUNDÁRIA À HEPATOPATIA  
ALCOÓLICA.**

Carlos Thadeu Schmidt Cerski

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação: Ciências em Gastroenterologia,  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra Themis Reverbel da Silveira

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Luise Meurer

Cerski, Carlos Thadeu Schmidt

Caracterização imunoistoquímica da população linfocitária septal e perisseptal na cirrose secundária a hepatopatia alcoólica / Carlos Thadeu Schmidt Cerski. –Porto Alegre: UFRGS, PPG: Ciências em Gastroenterologia, 2009

vi, 58f. : il.; 29 cm.

Orientador: Themis Reverbel da Silveira

Tese (doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, 2009

Referências Bibliográficas: f. 36-44

1. Cirrose alcoólica. 2. Infiltrado linfocitário septal. 3. Imunoistoquímica. 4. Patogênese. 5. Hepatologia-Tese. I. Silveira, Themis Reverbel da. II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia. III. Título.

**“What is the hardest thing of all? What seems the easiest to you: to use your eyes to see what lies in front of them.”**

**Goethe**

## DEDICATÓRIA

Dedico às mulheres da minha vida: Marcelle, Valesca, Alexandra, Natasha, Érika e Sarah para as quais soneguei o tempo, a atenção e o carinho que merecem, com as desculpas às vezes sinceras, às vezes não tão sinceras, da tese.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Themis Reverbel da Silveira que com seu conhecimento, sabedoria, entusiasmo, perseverança e muita paciência me estimulou durante todo este caminho.

Ao meu amigo Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros pela sua tolerância que só pode ser explicada pela nossa amizade.

A minha colega Dra. Tamara Candeia de Mattos pelas suas críticas ao meu trabalho e pela rotina que assumiu em meu lugar.

Aos técnicos Jorge Alberto Lopes, Neiva Copetti e Flávia Giusti que com carinho e eficiência realizaram a parte técnica deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| Lista de abreviaturas  | I   |
| Lista de tabelas   | II  |
| Lista de figuras   | III |
| Resumo   | IV  |
| Abstract   | V   |
| 1. Introdução  | 1   |
| 1.1 Aspectos morfológicos clássicos da hepatopatia alcoólica             | 1   |
| 1.2 Patogênese da hepatopatia alcoólica: ação direta do álcool           | 3   |
| 1.3 Patogênese da hepatopatia alcoólica: resposta inflamatória inata     | 7   |
| 1.4 Patogênese da hepatopatia alcoólica: resposta inflamatória adquirida | 9   |
| 1.5 Patogênese da hepatopatia viral C                                    | 11  |
| 1.6 Justificativa  | 15  |
| 2. Objetivos   | 16  |
| 3. Material e Métodos  | 17  |
| 3.1 Delineamento Geral   | 18  |
| 3.2 Amostra  | 18  |
| 3.3 Critérios de inclusão  | 19  |
| 3.4 Critérios de exclusão  | 19  |
| 3.5 Imunoistoquímica   | 20  |
| 3.6 Análise estatística  | 22  |
| 3.7 Aspectos éticos  | 22  |
| 4. Resultados  | 23  |
| 5. Discussão   | 32  |
| 6. Conclusões  | 35  |
| 7. Bibliografia  | 36  |
| 8. Anexos  | 45  |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

4-HNE = 4-hidroxinonenal

ADH3 = desidrogenase alcoólica-3

ALT = alaninaminotransferase

AST = aspartatoaminotransferase

B-CD20<sup>+</sup> = linfócito B CD20 positivo

C-HA = cirrose associada à hepatopatia alcoólica

C-VHC = cirrose associada ao vírus da hepatite C

GSH = glutatião mitocondrial

HE = coloração de hematoxilina/eosina

IL= interleucina

LPS = lipopolissacárides

MDA = malondialdeido

NADPH = fosfato dinucleotídeo de adenina nicotina

P4502E (CYP2E1) = citocromo p450E

PBS = tampão fosfato

PEPI = *Programs for Epidemiologists*, versão 4.0.

PPAR $\alpha$  = receptor de ativação/proliferação dos peroxissomas

RNS = radicais reativos do nitrogênio

ROS = radicais reativos do oxigênio

SAM = S-adenosilmetionina

T-CD4<sup>+</sup> = linfócito T CD4 positivo

T-CD8<sup>+</sup> = linfócito T CD8 positivo

TLR4 = receptores de membrana tipo toll 4

TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa

VHB = Vírus da hepatite B

VHC = Vírus da hepatite C

$\alpha$ -SMA = actina alfa de músculo liso



**LISTAS DAS TABELAS**

Tabela 1 – Comparação entre as populações linfocitárias septais nas cirroses associadas ao álcool e ao vírus C. Pag. 29

Tabela 2 – Comparação entre as populações linfocitárias na hepatite de interface (necrose em sacabocado) nas cirroses associadas ao álcool e ao vírus C. Pag. 30

**LISTA DE FIGURAS**

- Fig. 1 Ação do etanol sobre os mecanismos celulares que regulam o metabolismo lipídico hepatocitário (Nath & Szabo, 2009). Pag. 5
- Fig. 2 Células envolvidas na lesão hepática alcoólica. O aporte de endotoxinas originadas no aumento da permeabilidade intestinal causada pelo álcool, estimula as células de Kupffer a secretarem citocinas como o  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-1\alpha$  e  $IL-6$  que afetam as funções das células estelares e dos hepatócitos. As endotoxinas também afetam diretamente as células estelares e as endoteliais (Mandreakar e Szabo, 2009). Pag. 8
- Fig. 3 Célula de Kupffer: ação do etanol sobre os mecanismos celulares da resposta inflamatória inata induzida pelas endotoxinas provenientes do aumento da permeabilidade intestinal. Modelo murino (Nath & Szabo, 2009). Pag. 9
- Fig. 4 Representação esquemática da resposta imunológica celular durante a infecção aguda pelo HCV (Bowen et al, 2005). Pag. 14
- Fig. 5 Fluxograma dos pacientes submetidos a transplante hepático no período compreendido entre 1991 e 2007. Pag. 17
- Fig. 6 Cirrose associada ao VHC com infiltrado linfocitário septal difuso e marcada hepatite de interface. HE, 40X, 100X, 200X e 400X . Pag. 23
- Fig. 7 Cirrose associada à hepatopatia alcoólica com infiltrado linfocitário septal difuso e marcada hepatite de interface. Hematoxilina/Eosina; a 40X, b 100X, c 200X e d 400X . Pag.24
- Fig. 8 Cirrose associada ao VHC com infiltrado linfocitário septal difuso e marcada hepatite de interface. a) HE, 100X b) CD8, 400X c) CD4, 400X d) CD20, 40X. Pag. 25

Fig. 9 Cirrose associada à hepatopatia alcoólica com marcada hepatite de interface, 200X. a) hematoxilina /eosina, b) CD8, c) CD4, d) CD20. Pag. 26

Fig. 10 Cirrose associada à hepatopatia alcoólica com marcada hepatite de interface, 400X. a) hematoxilina /eosina, b) CD8, c) CD4, d) CD20. Pag. 27

Fig. 11 hepatite de interface com intenso componente CD20<sup>+</sup> em C-HA

a) HE b) CD20.

Pag. 28

## RESUMO

Introdução e objetivos: a patogênese da hepatopatia alcoólica envolve três mecanismos patogênicos. O primeiro corresponde à agressão direta do álcool e de seus resíduos metabólicos sobre os hepatócitos, o segundo é devido ao aporte de endotoxinas provenientes da circulação portal o que desencadeia uma resposta inflamatória inata, e o terceiro, uma provável resposta imunológica adquirida contra neoantígenos. Considerando a possibilidade deste último mecanismo patogênico ser similar ao da hepatite crônica, estudamos explantes de pacientes com cirrose alcoólica em abstinência e comparamos suas características imunoistoquímicas com cirróticos de etiologia viral C.

Materiais e métodos: foram estudados imunoistoquimicamente o infiltrado linfocitário septal e perisseptal de 34 explantes de cirróticos alcoólicos e 40 explantes de cirróticos virais C.

Resultados: na avaliação das colorações de HE, não houve diferença significativa entre os dois grupos. As alterações estatisticamente significativas encontradas foram: (a) nas C-VHC o componente T-CD8<sup>+</sup> intenso tanto na hepatite de interface como no infiltrado septal, neste último acompanhado pelos T-CD4<sup>+</sup>; (b) nas C-HA intenso componente linfocitário B-CD20<sup>+</sup> com presença de folículos linfóides nos septos fibrosos e, componente igualmente intenso, na hepatite de interface.

Conclusões: a hepatite de interface também ocorre nas C-HA e não difere, nas preparações histológicas habituais, daquela encontrada na C-VHC. O infiltrado linfocitário septal e perisseptal T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup> tende a ser mais difuso e intenso nas C-VHC e mais focal nas C-HA que apresenta um componente mais significativo de B-CD20<sup>+</sup>. O modelo por nós estudado, na medida em que afasta a ação direta do álcool e a da resposta inflamatória inata constitui um modelo promissor para o estudo da resposta inflamatória adquirida na patogênese da hepatopatia alcoólica.

## **ABSTRACT**

Introduction and objectives: the pathogenesis of alcoholic liver injury involves different cell types of the liver and leucocytes present in the innate immune response. Two different pathways are known: mitochondrial direct injury and damage related to endotoxins proceeding from the portal circulation. An immune adaptive response as a third mechanism of alcoholic liver injury was suggested by Thiele et. al. Considering this possibility, a similar mechanism usually seen in chronic hepatitis may be present. We studied the main immunohistochemical features on explants livers from C-HA patients in abstinence and compared them with explants from C-HCV patients.

Materials and Methods: an immunohistochemical study was achieved on 34 explants of the C-HA group of patients and on 40 explants of the C-HCV group. We focused our study on the septal lymphocyte inflammatory infiltrate and on interface hepatitis.

Results: the C-HCV group presented a diffuse septal lymphocyte inflammatory infiltrate, and lymphocytes focally positive for T-CD4, T-CD8 and B-C D20. An interface hepatitis was seen in 90% of the samples and lymphocytes were strongly positive for T-CD8, weakly positive for T-CD4 and negative for B-CD20(55,6%)

The C-HA group also presented a diffuse septal lymphocyte inflammatory infiltrate and lymphocytes focally positive for T-CD4, TCD8 and B-CD20. In a great number of samples (88,2 %) lymphoid follicles were identified. An interface hepatitis was seen in 70,6% of the explants and these lymphocytes were strongly positive for T-CD8 and B-CD20 and weakly positive for T-CD4.

Conclusion: an interface hepatitis may also occur in C-HA. By removing the effects of direct alcoholic injury and those of the innate inflammatory response we strongly recommend this model to study the immune adaptive response in the pathogenesis of alcoholic liver disease.

## **1. Introdução**

O álcool é uma droga legal, acessível, barata e, em baixas doses, origina as agradáveis sensações de euforia, autoconfiança e relaxamento. Estas razões, entre outras, torna o uso de álcool uma prática muito difundida no Brasil. Carlini e colaboradores<sup>(1)</sup>, em levantamento domiciliar sobre o uso de drogas, identificaram uma prevalência de 11,2% de brasileiros que preencheram os critérios para diagnóstico de dependência de álcool. Nesta amostragem, a prevalência entre os homens foi de 17% e de 5,7% entre as mulheres.

Em 2004, o levantamento de internações hospitalares no território nacional, com dados de 367 hospitais psiquiátricos, de um total de aproximadamente 600 hospitais existentes no país, revelou que 39.186 das 51.787 (75,67%) internações foram devidas ao alcoolismo<sup>(1)</sup>.

Prevalências desta magnitude justificam os estudos de todos os aspectos envolvidos no alcoolismo.

A patogênese da hepatopatia alcoólica é complexa e envolve a participação dos elementos celulares do parênquima hepático como os hepatócitos, as células de Kupffer, as células estrelares e as células endoteliais, além dos leucócitos que caracterizam a resposta inflamatória inata e, possivelmente, a adquirida.

### **1.1 Aspectos morfológicos clássicos da hepatopatia alcoólica**

A história natural da hepatopatia alcoólica inicia com esteatose e segue com esteato-hepatite, fibrose, cirrose de padrão micronodular e finalmente

hepatocarcinoma. Entre os alcoolistas pesados (homens que bebem diariamente 40 a 80g de álcool por um período de 10 a 12 anos e mulheres que bebem 20 a 40g de álcool pelo mesmo período), 90 a 100% desenvolvem esteatose hepática, 10 a 35% hepatite alcoólica e somente 8 a 20% evoluem para cirrose<sup>(2,3)</sup>.

Os achados histológicos são classicamente descritos como:

- a) Esteatose – de padrão macrogoticular, intensidade variada, inicia-se nos hepatócitos perivenulares e propaga-se em direção aos espaços-porta. Esta primeira fase não é acompanhada por outras alterações morfológicas, exceto por ocasionais lipogranulomas. É potencialmente reversível e pode desaparecer em 2 a 4 semanas de abstinência<sup>(4)</sup>. Até recentemente era considerada uma condição benigna, sem risco de progressão para cirrose. No entanto, Teli e colaboradores<sup>(5)</sup> juntamente com Dam-Larsen<sup>(6)</sup> mostram em seus trabalhos a possibilidade de progressão do quadro de esteatose para cirrose. Apesar da esteatose macrogoticular pura não ser uma lesão com manifestações clínicas importantes, ela constitui uma base para o desenvolvimento de uma esteato-hepatite alcoólica ou não alcoólica<sup>(7)</sup>.
- b) Esteato-hepatite – nesta fase identificamos: (a) sinais histológicos de sofrimento hepatocelular, caracterizados por esteatose macro e microgoticular, balonização hepatocitária e corpúsculos hialinos de Mallory; (b) sinais histológicos de morte celular por necrose e apoptose; (c) sinais histológicos de resposta inflamatória inata, representada pela presença de infiltrado neutrocitário parenquimatoso, e (d) sinais histológicos de reparo com a presença de fibrose perivenular e perissinusoidal<sup>(4,8,9)</sup>.
- c) Fibrose/cirrose – nesta última fase, a fibrose iniciada nas zonas perivenulares propaga-se pelos espaços

perissinusoidais, estabelece pontes fibrosas centro-centro, posteriormente centro-porta e, finalmente, uma cirrose de padrão micronodular. Todas estas alterações iniciam-se nas zonas três (perivenulares), local do parênquima hepático onde começa a agressão do álcool<sup>(4,8,9)</sup>.

## **1.2 Patogênese da hepatopatia alcoólica: ação direta do álcool**

Um dos mecanismos patogênicos da hepatopatia alcoólica mais estudado aborda a agressão direta do álcool e de seus resíduos metabólicos sobre as mitocôndrias dos hepatócitos. Ele se desenrola durante o uso do álcool e cessa com a abstinência.

A primeira das manifestações hepáticas do uso do álcool é a esteatose macrogoticular, acúmulo hepatocitário de triglicerídeos, que tem as seguintes causas: (a) mobilização aumentada dos ácidos graxos dos tecidos periféricos para o fígado; (b) aumento da síntese de ácidos graxos pelos próprios hepatócitos; (c) aumento da síntese de glicerol; (d) diminuição da oxidação nas mitocôndrias; (e) dificuldade de mobilização dos mesmos devido à diminuição de apoproteínas, e (f) disfunção do citoesqueleto, representado em sua forma extrema pelos corpúsculos hialinos de Mallory. Todas estas alterações levam a um aumento da síntese e uma diminuição da mobilização, com conseqüente acúmulo de triglicerídeos<sup>(10)</sup>.

Nesta fase inicial de esteatose pura, os humanos não apresentam alterações clínicas e laboratoriais significativas, entretanto estudos com modelos experimentais, especialmente em roedores, revelam que numerosos mecanismos moleculares já estão em desenvolvimento<sup>(11)</sup>, assim como leves alterações enzimáticas e, inclusive, presença de neoantígenos. São eles os seguintes:

- a) indução da síntese de citocromo hepático P4502E (CYP2E1)<sup>(12)</sup>;



- b) ativação da NADPH oxidase e da xantina oxidase<sup>(13)</sup>;
- c) diminuição dos níveis mitocondriais de glutatião mitocondrial (GSH)<sup>(14)</sup>;
- d) diminuição dos níveis de S-adenosilmetionina (SAM)<sup>(15)</sup>;
- e) aumento dos depósitos de ferro hepático<sup>(16)</sup>;
- f) aumento da expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>(17)</sup>;
- g) elevação da aspartatoaminotransferase sérica (AST)<sup>(17,18)</sup>;
- h) indução de apoptose de hepatócitos<sup>(19)</sup>;
- i) aumento dos níveis de fibronectina e de actina alfa de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)<sup>(20)</sup>;
- j) aumento da resistência a insulina e do fator inibidor do ativador do plasminogenio<sup>(21,22)</sup>; e
- k) aumento dos níveis hepáticos de produtos tóxicos de peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e do malondialdeído (MDA)<sup>(15,19,23,24)</sup>.

Nath e Szabo<sup>(25)</sup>, revisando o modelo experimental murino, resumem os mecanismos moleculares hepatocitários que são alterados pelo etanol e que levam ao acúmulo de triglicerídeos (Fig. 1). Salientam a importância da ação do PPAR- $\alpha$  na supressão de acúmulo de lipídios. O PPAR é uma família de proteínas que agem sobre receptores nucleares exercendo um efeito transcripcional no metabolismo dos lipídios. Uma vez estimulados, bloqueiam a deposição de lipídios. O etanol suprime a expressão gênica do PPAR<sup>(26)</sup>.

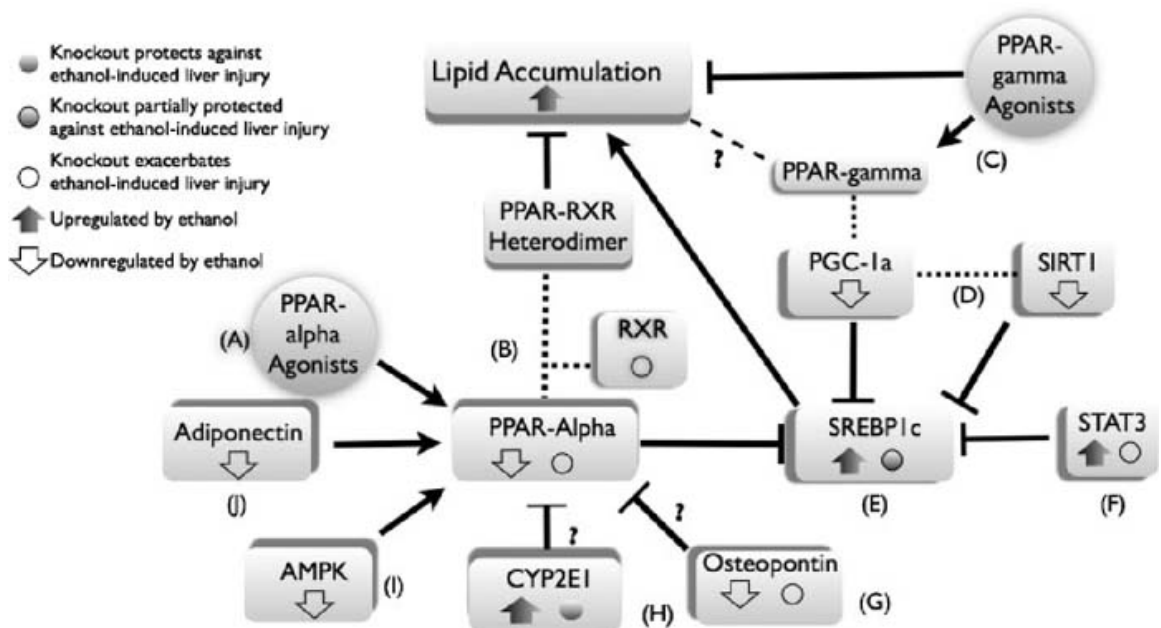


Fig. 1 Ação do etanol sobre os mecanismos celulares que regulam o metabolismo lipídico hepatocitário (Nath & Szabo, 2009).

No entanto, por razões mal conhecidas, em pouco menos de 30% dos alcoolistas crônicos<sup>(2)</sup> estes mecanismos moleculares estão significativamente alterados, determinando a progressão da esteatose pura para o próximo estágio da doença, a esteato-hepatite. Numerosos estudos têm demonstrado variações nas enzimas envolvidas no metabolismo do etanol em pacientes orientais<sup>(27,28,29)</sup> e levantam a possibilidade do polimorfismo das aldeidodesidrogenases e das desidrogenases alcoólicas desempenharem um papel na predisposição genética da lesão hepática. Entre os caucasianos, têm sido descritos polimorfismos da desidrogenase alcoólica-3 (ADH3) e do CYP2E1<sup>(30)</sup>. Os resultados obtidos até agora são pouco consistentes e, a rigor, ainda não há estudos robustos que esclareçam quais são os fatores determinantes desta progressão.

Na presença de esteato-hepatite, identificam-se alterações ultraestruturais hepatocitárias caracterizadas por mitocôndrias aumentadas e disformes (megamitocôndrias), com lise das cristas internas e inclusões cristalóides, além de alterações do citoesqueleto hepatocitário traduzidas na forma de corpúsculos de Mallory. Estes achados são acompanhados por proliferação do retículo endoplasmático liso, esteatose e edema hepatocitário<sup>(4,30,31)</sup>.

A mitocôndria é o local onde ocorre o metabolismo do acetaldeído. Como consequência, as alterações mitocondriais são provavelmente devidas ao estresse oxidativo originado neste metabolismo, que, além da sua ação tóxica direta, origina radicais livres como os radicais reativos do oxigênio (ROS), os radicais reativos do nitrogênio (RNS) e aumento da deposição de ferro. Estes fatores são potencializados pelos mediadores da resposta inflamatória, características genéticas<sup>(32)</sup>, lipotoxicidade<sup>(33)</sup> e pela depleção de SAM e de GSH<sup>(14,15)</sup>.

A elevação da aspartatoaminotransferase (AST) plasmática acompanha a lesão mitocondrial hepatocitária, e justifica o uso do índice AST/ALT acima de dois, como indicativo laboratorial de doença alcoólica hepática<sup>(34)</sup>.

As alterações celulares iniciam-se nos hepatócitos da zona 3, centrolobulares, e a partir daí propagam-se para o restante do lóbulo<sup>(35)</sup>. As razões para esta localização característica são as seguintes: (1) os hepatócitos perivenulares situam-se distalmente aos espaços-porta por onde aportam os nutrientes; (2) são as células mais velhas desta população, visto que se originam principalmente das células ovais localizadas na placa limitante; (3) possuem o sistema citocromo P450-CYP2E1 mais desenvolvido (15), conseqüentemente geram maior quantidade de resíduos metabólicos tóxicos; (4) possuem uma menor reserva de glutatião e de S-adenosilmetionina. Isto significa que metabolizam maior volume de álcool, geram maior volume de metabólitos

tóxicos e possuem um sistema de defesa mais frágil contra os radicais livres.

### **1.3 Patogênese da hepatopatia alcoólica: resposta inflamatória inata**

Um segundo mecanismo patogênico é devido ao aporte hepático de endotoxina/lipopolissacáride pela circulação portal o que desencadeia uma resposta inflamatória inata.

Estudos em humanos<sup>(36)</sup> e em animais de experimentação<sup>(37,38,39,40)</sup>, expostos cronicamente ao álcool, demonstram uma disfunção intestinal com aumento da permeabilidade da mucosa que permite a absorção de endotoxinas constituídas por lipopolissacárides derivados da parede de bactérias comensais gram negativas. Estes lipopolissacárides são identificados na corrente circulatória de alcoolistas<sup>(41,42)</sup> e de ratos expostos ao etanol por infusão gástrica<sup>(43)</sup>. Na circulação portal, estas substâncias são reconhecidas pelas células de Kupffer através dos receptores de membrana tipo toll 4 (TLR4)<sup>(44,45)</sup>. A ativação destes receptores desencadeia a ativação dos fatores de transcrição NFκB, AP-1 e EGR-1, que determinam a síntese e secreção de citocinas inflamatórias como as interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e principalmente o TNF $\alpha$ . Este último mediador induz a apoptose de hepatócitos sensibilizados e estimula a transformação das células estelares em fibroblastos, o que é caracterizado pelo aumento de  $\alpha$ -SMA<sup>(46)</sup>.

Mandrekar e Szabo<sup>(46)</sup>, em trabalho de revisão, resumem de forma didática todos estes fatores envolvidos na resposta inflamatória inata (Fig. 2).

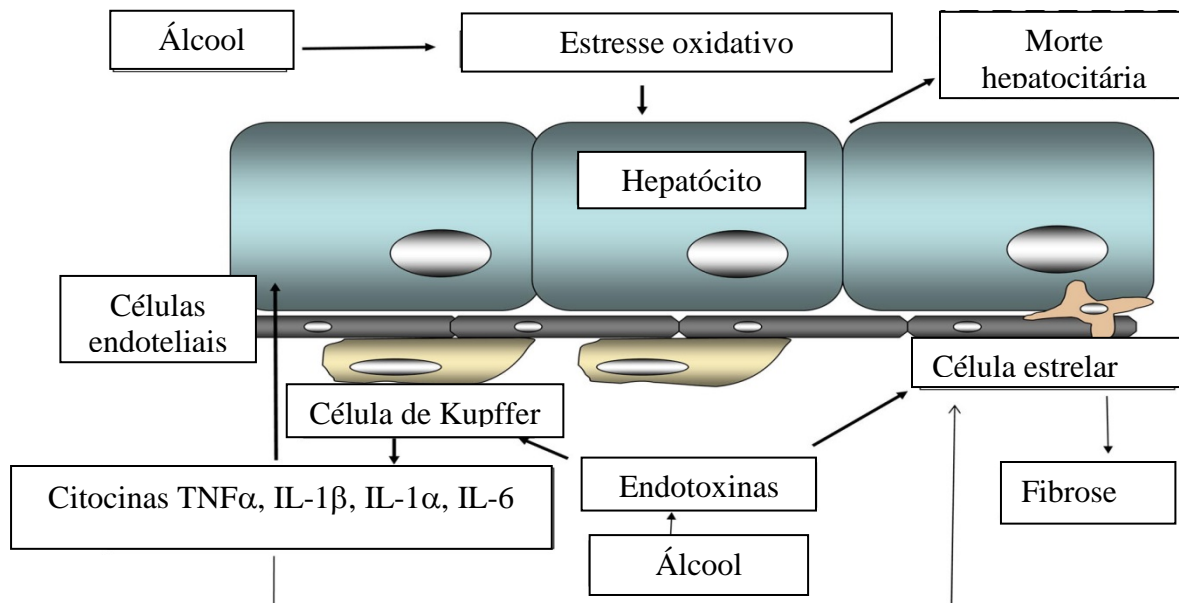


Fig. 2 Células envolvidas na lesão hepática alcoólica. O aporte de endotoxinas originadas no aumento da permeabilidade intestinal causada pelo álcool estimula as células de Kupffer a secretarem citocinas como o  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-1\alpha$  e  $IL-6$ , que afetam as funções das células estelares e dos hepatócitos. As endotoxinas também afetam diretamente as células estelares e as endoteliais (Modificado de Mandrekar e Szabo, 2009) .

O aumento da permeabilidade da mucosa intestinal também é causado pelos estrógenos<sup>(37,47)</sup> o que potencializa a ação do álcool e seria um dos fatores que explicam a maior sensibilidade das mulheres no desenvolvimento das lesões hepáticas. Os estrógenos além de aumentarem a permeabilidade da mucosa intestinal, aumentam a expressão dos receptores de endotoxina do tipo CD14 nas células de Kupffer e consequentemente aumentam a produção de  $TNF\alpha$ <sup>(46)</sup>.

Nath e Szabo<sup>(25)</sup>, revisando os modelos experimentais murinos, focaram a discussão nas alterações moleculares que ocorrem nas células de Kupffer

durante a resposta inflamatória induzida pela presença de lipopolissacárides na circulação portal. Salientam a importância dos receptores de membrana TLR4, MD2 e CD14 no reconhecimento antigênico destas endotoxinas, a transcrição deste estímulo com a síntese e secreção de TNF $\alpha$ . Estes mecanismos estão representados na figura 3.

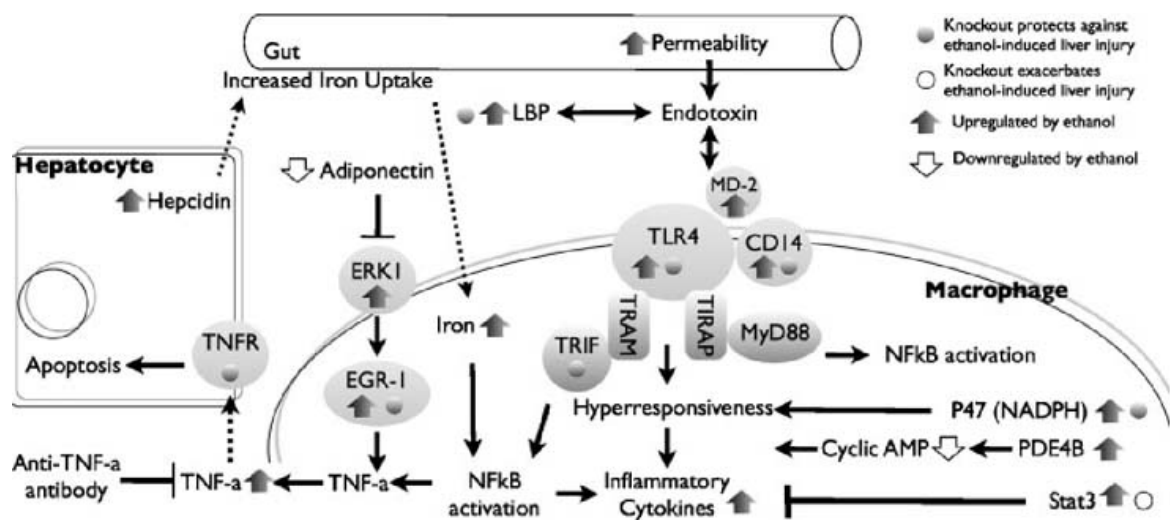


Fig. 3 Célula de Kupffer: ação do etanol sobre os mecanismos celulares da resposta inflamatória inata induzida pelas endotoxinas provenientes do aumento da permeabilidade intestinal. Modelo murino (Nath & Szabo, 2009).

#### 1.4 Patogênese da hepatopatia alcoólica: resposta inflamatória adquirida

Biópsias hepáticas de pacientes alcoolistas sem outras causas associadas de hepatopatia apresentam eventualmente, além dos aspectos clássicos da esteato-hepatite já descritos, infiltrado inflamatório portal predominantemente linfocitário, com ocasionais focos de hepatite de interface (necrose em saca-bocado). Trabalhos das décadas de 70 e 80 (48,49,50,51,52,53) chamam a atenção para essa alteração periportal nas hepatites alcoólicas. Como neste período não havia a possibilidade do

diagnóstico sorológico de hepatite viral C, esses achados foram atribuídos a uma possível sobreposição das duas entidades.

Em 2002, Colombat e colaboradores<sup>(54)</sup>, eliminando este viés, realizaram um trabalho retrospectivo no qual estudaram 200 pacientes com hepatopatia alcoólica. Neles identificaram infiltrado linfocitário portal ou septal em 40% dos indivíduos e hepatite de interface em 15%. Estes achados histológicos são classicamente atribuídos às hepatites crônicas de etiologia viral B, C e D, hepatites auto-imunes e medicamentosas, e mais raramente a Doença de Wilson. A hepatite de interface (necrose em saca-bocado) tem como fundamento a agressão da placa limitante por linfócitos T-CD8 citotóxicos<sup>(55,56,57)</sup>.

Estes achados somam-se a outras alterações autoimunes já descritas nas hepatopatias alcoólicas, como: auto-anticorpos circulantes, hipergamaglobulinemia, anticorpos contra antígenos hepatocitários e linfócitos citotóxicos que reagem contra hepatócitos autólogos<sup>(55,58,59,60)</sup>.

A idéia de uma agressão mediada pela resposta inflamatória adquirida contra neoantígenos hepatocitários, no alcoolismo crônico, é sustentada por várias evidências como: (a) anticorpos anti proteína fígado-específica presentes em 27 a 29% dos pacientes com hepatopatia alcoólica<sup>(61)</sup>; (b) correlação destes anticorpos com a atividade de interface<sup>(62)</sup>; (c) anticorpos contra antígeno hepatocitários de membrana<sup>(61,62)</sup>, e (d) anticorpos contra aductos da CYP2E1<sup>(63)</sup>.

Em promissores estudos experimentais, Thiele e colaboradores<sup>(64,65)</sup> mostraram que aductos do MDA são capazes de produzir uma resposta imunológica mesmo na ausência de adjuvantes. Registraram ainda, que esta resposta é acompanhada por alterações histológicas consistentes com hepatopatia alcoólica.

Com base nestes dados, Thiele e colaboradores sugerem que uma resposta inflamatória adquirida tem um papel significativo na indução e na manutenção da lesão hepatocitária na hepatopatia alcoólica<sup>(60)</sup>.

Lemmers e colaboradores<sup>(66)</sup> em trabalho recente, demonstraram a presença e a ativação de linfócitos CD4 Th17 na hepatopatia alcoólica. Estes linfócitos produzem IL-17, IL-21 e IL-22<sup>(67,68)</sup>, tem um importante papel na defesa contra infecções bacterianas e participam de doenças autoimunes como retocolite ulcerativa, doença de Crohn, psoríase, artrite reumatóide e esclerose múltipla<sup>(69)</sup>.

Albano e colaboradores<sup>(70,71,72,73)</sup>, considerando a alta prevalência de IgG e de linfócitos sensibilizados com proteínas modificadas pelos radicais livres do hidroxietil e produtos de peroxidação lipídica, concluem que a resposta imune adaptativa gerada contra estes neoantígenos é um importante fator na patogênese da hepatopatia alcoólica.

### **1.5 Patogênese da hepatopatia viral C**

O vírus da hepatite C é capaz de escapar dos sistemas de defesa em mais de 70% dos pacientes por ele infectado. Conforme Bowen e Walker, é um dos vírus que de maneira mais eficientemente atinge este objetivo<sup>(74)</sup>. Entre os pacientes que desenvolvem uma hepatopatia crônica, 20% progridem para cirrose e 2,5%, para hepatocarcinoma<sup>(75)</sup>.

Ao exame histológico nas hepatites crônicas pelo VHC vamos encontrar, como sinais de atividade, infiltrado inflamatório linfocitário portal, periportal e parenquimatoso. Estas características são comuns a todas as hepatites crônicas, independentemente das suas etiologias. Neste contexto, os sinais histológicos que sugerem a possibilidade de etiologia viral C são os achados de ductulite, folículos linfóides e esteatose macrogoticular<sup>(76,77)</sup>. A atividade inflamatória periportal, ou hepatite de interface, é geralmente leve



a moderada. Ela é uma consequência da agressão aos hepatócitos periportais mediada pelos linfócitos T-CD8<sup>+</sup> que os induzem a apoptose<sup>(78)</sup>.

O controle da replicação viral na fase aguda inicial está associado à proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> <sup>(74)</sup>. No entanto, a resolução natural da hepatite aguda, apesar de reduzir os riscos de uma progressão para hepatite crônica numa reinfecção, não confere obrigatoriamente imunidade quando da re-exposição ao VHC <sup>(79,80)</sup>.

A erradicação do VHC, que ocorre em menos de 30% dos humanos infectados<sup>(74)</sup>, está diretamente relacionada à resposta imunológica celular. Nestes a viremia manifesta-se precocemente e a resolução é traduzida pelo aumento dos linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>, usualmente acompanhada por elevação das transaminases (fig. 4c). Esta resposta gera memória imunológica celular que costuma persistir por décadas<sup>(81)</sup>. Alterações semelhantes são descritas em chimpanzés<sup>(82)</sup>.

O sucesso desta resposta imunológica deve-se, aparentemente, ao fato de dirigir-se contra múltiplos epitopos das proteínas estruturais e não-estruturais do VHC, reconhecidos pelo sistema de histocompatibilidade da classe I<sup>(82,84,85,86)</sup>.

Na grande maioria dos pacientes infectados pelo VHC a viremia também se manifesta precocemente e, apesar de uma queda nos níveis plasmáticos acompanhado por um leve aumento das transaminases e dos linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>, persiste (Fig. 4a). Curiosamente, mesmo na ausência de doença hepática avançada, a falta de uma resposta imune celular eficiente parece ser específica para o VHC<sup>(86)</sup>.

Nestes casos de progressão da doença, os linfócitos T-CD8<sup>+</sup> tem sido descritos como portadores de um fenótipo imaturo<sup>(87,88)</sup> e reconhecem antigenicamente poucos epitopos do VHC<sup>(86)</sup>.

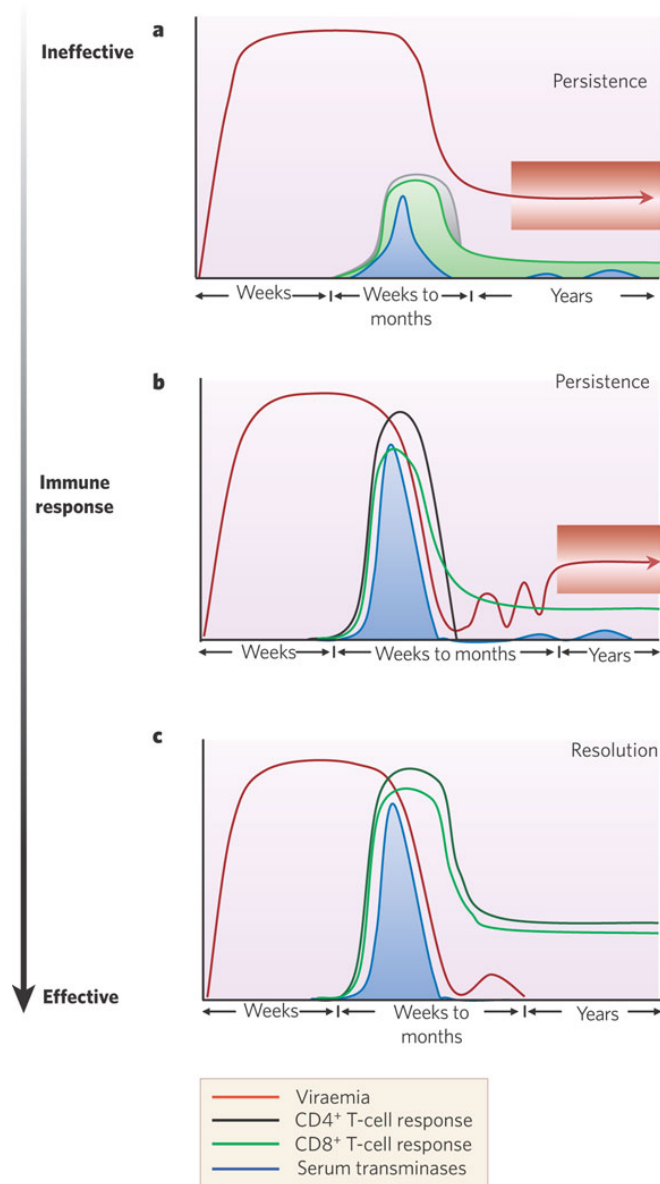


Fig. 4 Representação esquemática da resposta imunológica celular durante a infecção aguda pelo HCV (Bowen et al, 2005)

## **1.6 Justificativa**

As informações presentemente disponíveis apontam para a possibilidade de que o mecanismo imunológico identificado em parte dos casos de hepatopatia alcoólica é similar ao que acontece nas hepatites crônicas. Para investigar esta questão, estudamos explantes de pacientes com cirrose secundária ao alcoolismo. Estes indivíduos submeteram-se por um período mínimo de seis meses de abstinência alcoólica para serem incluídos na lista de candidatos a transplante hepático, e esperaram por dois a dezoito meses pela realização do mesmo. Isto implica em um tempo mínimo de oito meses sem uso de álcool, suficiente para eliminar as ações tóxicas diretas do etanol. A análise histológica destes explantes suporta a hipótese de abstinência, na medida em que a esteato-hepatite estava ausente e a esteatose, nos poucos casos identificados, era discreta (menos de 5%).

O presente trabalho compara as características imunoistoquímicas do infiltrado inflamatório septal e perisseptal identificados nas cirroses secundárias ao alcoolismo com aquelas identificadas nas cirroses de etiologia viral C.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Caracterizar imunohistoquimicamente o infiltrado linfocitário septal e perisseptal nas cirroses associadas ao alcoolismo e compará-lo com o infiltrado linfocitário septal e perisseptal das cirroses associadas ao vírus da hepatite C.

### **2.2 Específicos**

- a) avaliar a prevalência da hepatite de interface (necrose em sacabocado) em explantes hepáticos de pacientes com cirrose alcoólica;
- b) avaliar o componente linfocitário CD8<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório septal das C-HA e compará-lo com o da C-VHC;
- c) avaliar o componente linfocitário CD4<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório septal das C-HA e compará-lo com o da C-VHC;
- d) avaliar o componente linfocitário CD20<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório septal das C-HA e compará-lo com o da C-VHC;
- e) avaliar o componente linfocitário CD8<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório da hepatite de interface (necrose em sacabocado) das C-HA e compará-lo com o da C-VHC;
- f) avaliar o componente linfocitário CD4<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório da hepatite de interface (necrose em sacabocado) das C-HA e compará-lo com o da C-VHC;
- g) avaliar o componente linfocitário CD20<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório da hepatite de interface (necrose em sacabocado) das C-HA e compará-lo com o da C-VHC.

### 3. Material e métodos

No período compreendido entre 1991 e 2007, 886 pacientes foram submetidos a transplante hepático no Hospital das Clínicas de Porto Alegre e na Santa Casa de Misericórdia. Todos os explantes foram examinados pelo autor (CTSC). Destes, 769 eram adultos e 117 eram crianças. Entre os adultos, 652 eram cirróticos, dos quais 57 tinham álcool como etiologia única, sendo 55 pacientes do sexo masculino e 2 do feminino. Desta população inicial de 57 pacientes, três apresentaram esteatose severa, dois esteato-hepatite e dezoito hepatocarcinoma, sendo eliminados da amostra em estudo, resultando 34 pacientes com cirrose alcoólica sem outra patologia associada (Fig. 5).

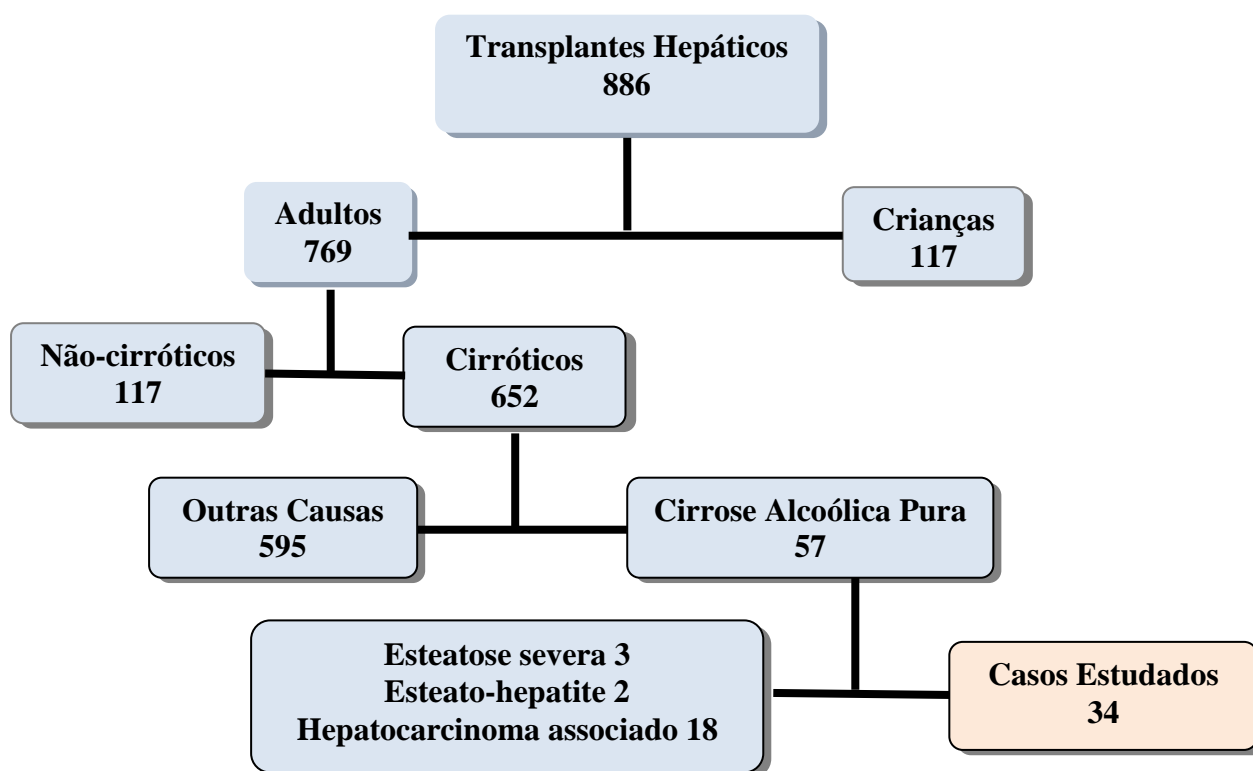


Fig. 5 Fluxograma dos pacientes submetidos a transplante hepático no período compreendido entre 1991 e 2007.

### **3.1 Delineamento Geral**

Estudo transversal com análise comparativa do grupo de cirrose alcoólica com o grupo de cirrose viral C.

### **3.2 Amostra**

O grupo C-HA é constituído por 34 explantes hepáticos de pacientes submetidos a transplante de fígado por cirrose associada à hepatopatia alcoólica. Ou seja, todos os casos que preencheram os critérios de inclusão no período estudado.

Os pacientes do grupo C-HA submeteram-se a um mínimo de seis meses de abstinência, exigidos pelas nossas equipes médicas, para serem incluídos na lista de candidatos. O tempo de espera pelo transplante variou entre 2 e 18 meses, o que somado aos seis meses de abstinência exigidos, completa um mínimo de 8 meses sem uso de álcool. Durante estes períodos todos foram acompanhados por equipes de profissionais constituídas por psiquiatras e assistentes sociais.

O tempo de alcoolismo informado pelos pacientes variou de 12 a 40 anos, enquanto o tempo de abstinência variou de 11 meses a 20 anos.

O grupo C-VHC é constituído por 40 explantes hepáticos de pacientes submetidos a transplante de fígado por cirrose associada ao vírus da hepatite C.

### **3.3 Critérios de inclusão**

#### 1.1.1 Grupo C-HA:

- cirrose
- história de alcoolismo de grande duração
- abstinência mínima de seis meses

#### 1.1.2 Grupo C-VHC

- cirrose
- sorologia positiva para o VHC

### **3.4 Critérios de exclusão**

#### 3.4.1 Grupo C-HA:

- sorologia positiva para VHC ou VHB
- presença de esteato-hepatite na avaliação histológica do transplante
- presença de hepatocarcinoma ou de qualquer outro processo expansivo intra-hepático
- obesidade mórbida
- qualquer outra hepatopatia associada

#### 3.4.2 Grupo C-VHC

- sorologia positiva para o VHB
- presença de hepatocarcinoma ou de qualquer outro processo expansivo intra-hepático
- obesidade mórbida
- qualquer outra hepatopatia associada

### 3.5 Imunoistoquímica

De cada explante hepático o nosso arquivo dispõe de pelo menos sete amostras teciduais em blocos de parafina, sendo duas do lobo direito, duas do lobo esquerdo, duas do hilo hepático e uma da vesícula biliar quando presente. Qualquer alteração macroscópica identificada originou amostras suplementares. Os explantes foram fixados em formalina a 10% por um período que variou entre 24 e 72 horas. Destas amostras foi selecionada aquela que apresentava ao exame histológico o maior infiltrado inflamatório e encaminhada para exame imunoistoquímico.

Os anticorpos primários utilizados no exame imunoistoquímico foram:

- 1) anti-CD8 (Novocastra NCL-CD8-295) na diluição de 1:40; com recuperação antigênica a alta temperatura, utilizando solução de citrato a 0,01M, pH 6,0.
- 2) anti-CD4 (Novocastra NCL-CD4-1F6) na diluição de 1:40; com recuperação antigênica a alta temperatura, utilizando solução de citrato a 0,01M, pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol por 10 minutos, antes da recuperação antigênica.
- 3) Anti-CD20 (Novocastra NCL-CD20-7D1) na diluição de 1:40; com recuperação antigênica a alta temperatura, utilizando solução de citrato a 0,01M, pH 6,0.

#### Técnica Imunoistoquímica

1. Desparafinização: três banhos de xilol de 10 minutos cada.
2. Hidratação: quatro passagens rápidas em álcool a 100%.
3. Hidratação: um banho de 5 minutos em álcool .
4. Hidratação: lavar em água corrente.
5. Hidratação: lavar em água destilada.
6. Hidratação: três banhos de 5 minutos cada em PBS.
7. Recuperação antigênica: 30 minutos em banho-maria a 98<sup>o</sup>C com tampão citrato 0,01M, pH 6,0.



8. Retirar as lâminas do banho-maria e deixar por 20 minutos em temperatura ambiente.
9. Lavar com água corrente e destilada.
10. Três banhos de 5 minutos cada, em PBS.
11. Bloqueio da peroxidase endógena: peróxido de hidrogênio a 5% (preparado com água destilada), dois banhos de 15 minutos. Observação: na preparação das lâminas para o CD4, foi utilizado um banho de 10 minutos com peróxido de hidrogênio a 0,5% em metanol.
12. Lavar em água corrente e destilada.
13. Três banhos de 5 minutos cada, em PBS.
14. Bloqueio de reações inespecíficas: um banho de 30 minutos em soro normal a 5% diluído em PBS.
15. Lavar em água corrente e destilada.
16. Três banhos de 5 minutos cada, em PBS.
17. Circular os corte com caneta “Dako-Pen”.
18. Incubar com o anticorpo primário, em câmara úmida, a 4°C (geladeira), durante a noite (“overnight”).
19. Lavar as lâminas individualmente com PBS.
20. Três banhos de 5 minutos cada, em PBS.
21. Anticorpo secundário: foi utilizado o “DAKO EmVision System, Peroxidase”.
22. Contra-coloração: hematoxilina de Harris por 20 a 30 segundos.
23. Lavar em água destilada.
24. Um mergulho rápido em amônia a 2%.
25. Lavar em água corrente.
26. Cinco banhos em álcool a 100%.
27. Três banhos em xilol.
28. Montar as lâminas.

A leitura das lâminas foi realizada às cegas, por dois patologistas (CTSC e LM). Os casos de discrepância foram re-examinados e decididos por consenso. A análise das mesmas focou-se no infiltrado linfocitário septal e na hepatite de interface (necrose em saca-bocado). O infiltrado linfocitário septal foi registrado como ausente, focal ou difuso, enquanto a hepatite de interface foi registrada como ausente, leve (focal, em poucos ou muitos septos) ou intensa (contínua em poucos ou muitos septos).

### **3.6 Análise estatística**

As variáveis foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Para avaliar a associação entre as variáveis foi aplicado o teste qui-quadrado de Pearson. Em caso de significância, o teste dos resíduos ajustados foi utilizado para localizar as diferenças.

O nível de significância foi de 5% ( $\leq 0,05$ ) e as análises foram realizadas no programa PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0.

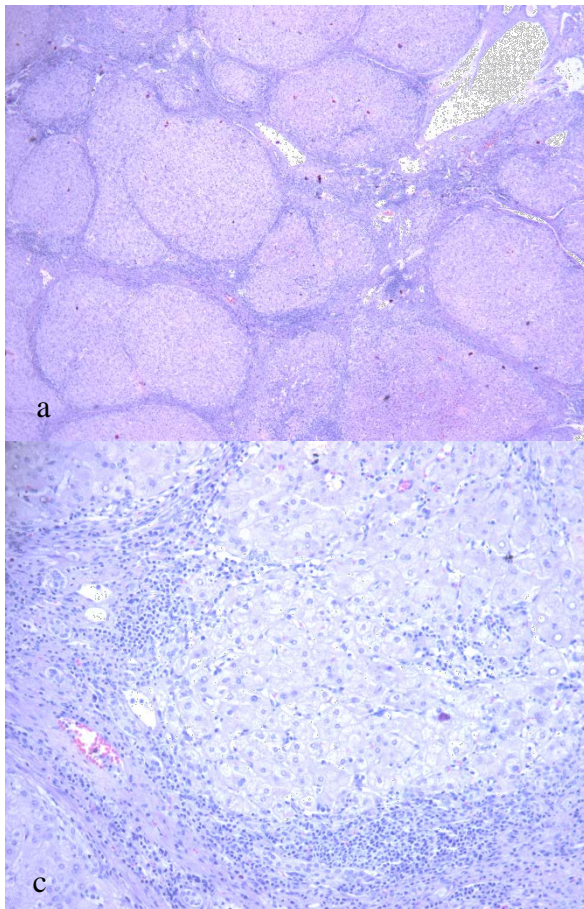
### **3.7 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os autores comprometem-se a divulgar os resultados do trabalho preservando o anonimato dos pacientes.

#### 4. Resultados

A avaliação de várias amostras provenientes dos explantes hepáticos mostrou um infiltrado linfocitário septal em todos os 40 casos de cirrose secundária ao VHC (Fig. 6) e em 33 dos 34 casos de cirrose alcoólica (Fig. 7). Há uma tendência do infiltrado linfocitário se apresentar com padrão difuso na C-VHC e com um padrão focal na C-HA (tabela 1).



b

d

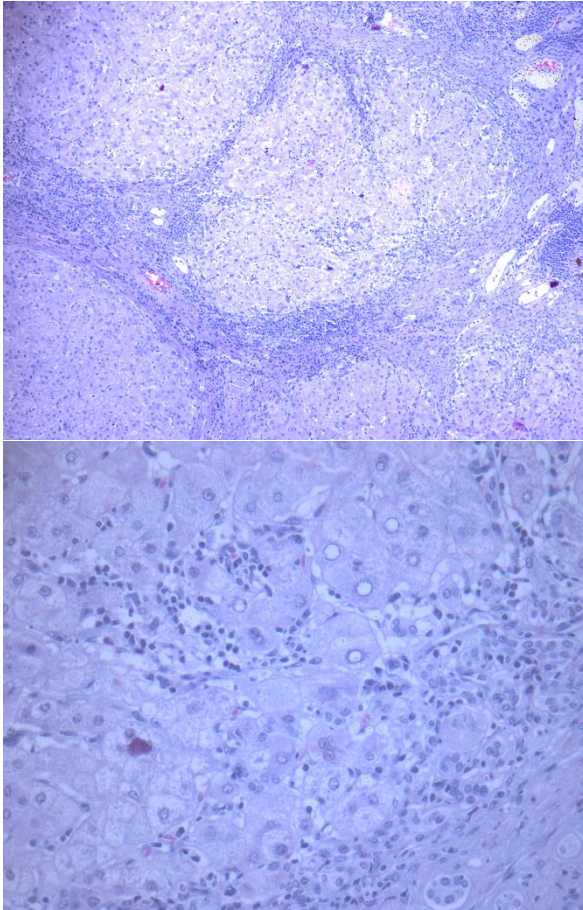


Fig. 6 Cirrose associada ao VHC com infiltrado linfocitário septal difuso e marcada hepatite de interface. HE, 40X, 100X, 200X e 400X .

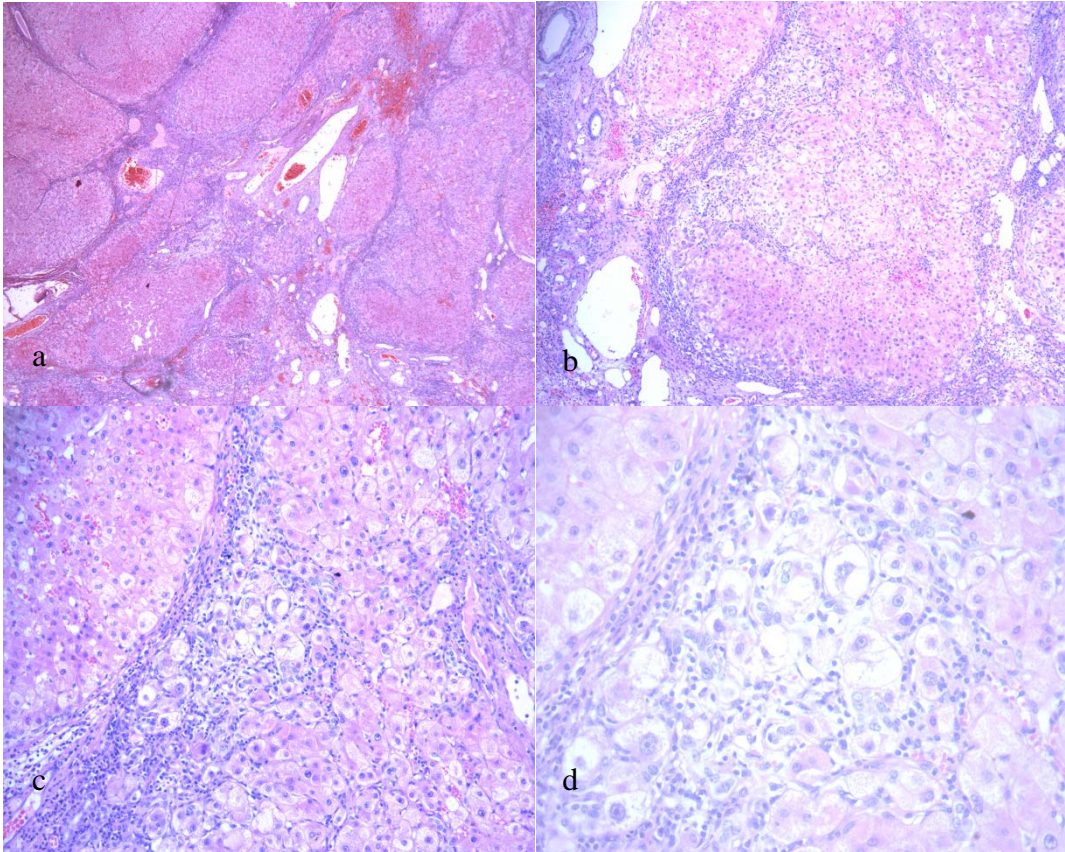


Fig. 7 Cirrose associada à hepatopatia alcoólica com infiltrado linfocitário septal difuso e marcada hepatite de interface. Hematoxilina/Eosina; a 40X, b 100X, c 200X e d 400X .

Linfócitos T-CD8<sup>+</sup> estavam presentes nos septos de todos os casos de C-VHC (Fig. 8) e em 32 dos 34 casos de C-HA (Fig. 9). Houve uma diferença significativa com relação ao componente difuso caracterizando as C-VHC ( $p < 0,046$ ) (tabela 1).

Linfócitos T- CD4<sup>+</sup> também foram identificados em todos os casos de C-VHC (Fig. 8) e em 27 dos 34 casos de C-HA (Fig. 9). Houve uma diferença significativa com relação ao componente difuso nas C-VHC e nos casos negativos das C-HA ( $p < 0,002$ ) (tabela 1).

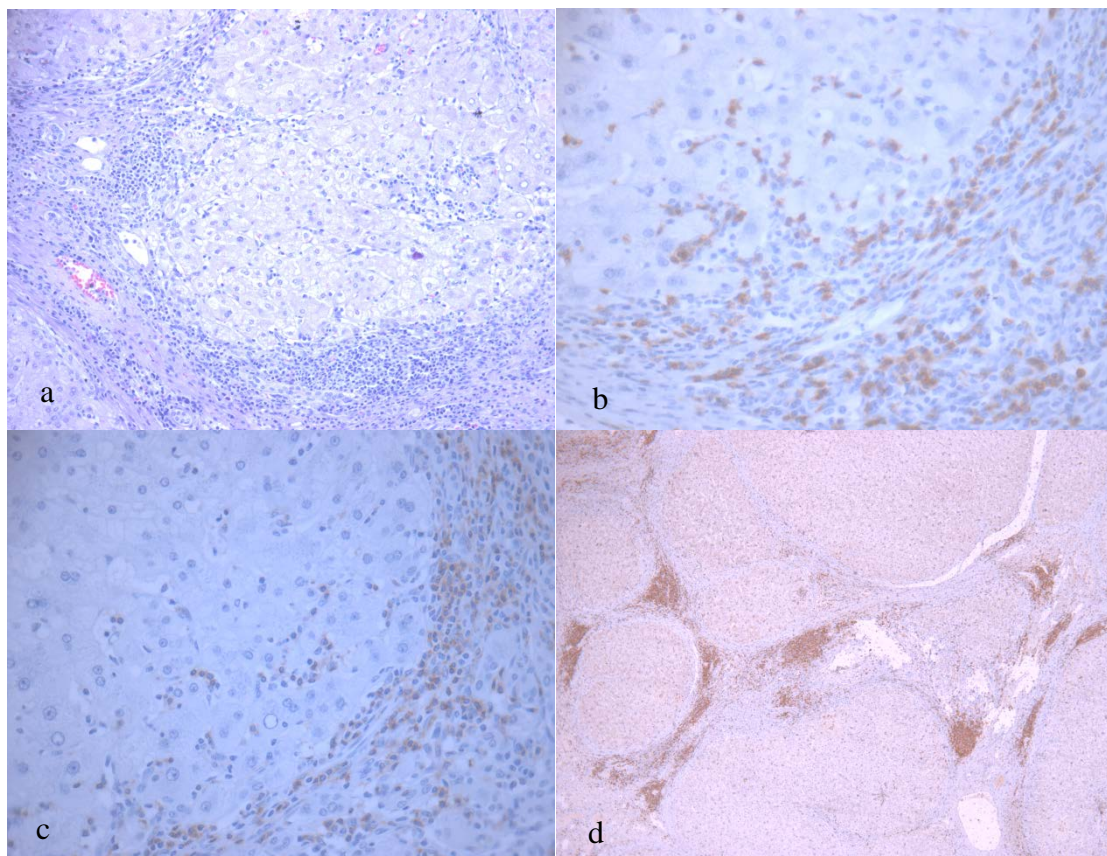
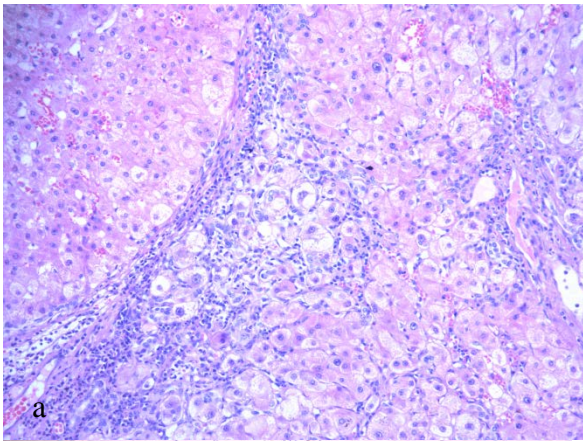


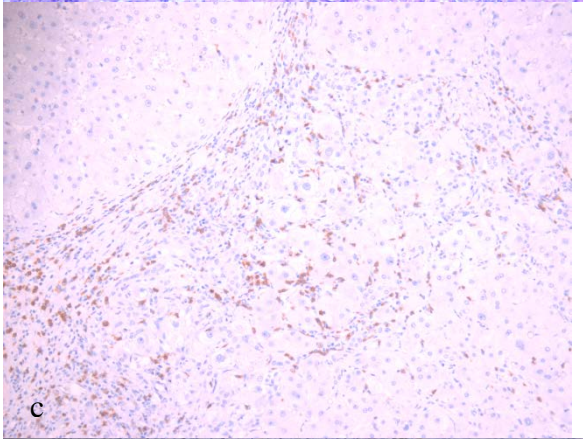
Fig. 8 Cirrose associada ao VHC com infiltrado linfocitário septal difuso e marcada hepatite de interface. a) HE, 100X b) CD8, 400X c) CD4, 400X d) CD20, 40X

Linfócitos B- CD20<sup>+</sup> foram identificados nos septos de todos os casos de C-VHC (Fig. 8) e de C-HA (Fig. 9). Não houve diferenças significativas quanto à distribuição focal ou difusa, entretanto os folículos linfóides foram visualizados mais frequentemente entre os espécimes originados das C-HA ( $p < 0,001$ ) (tabela 1).

A hepatite de interface (necrose em saca-bocado) foi identificada em 36 dos 40 casos de C-VHC (90%) (Fig. 8) e em 24 dos 34 casos de C-HA (70,6%) (Fig. 9 e 10), diferença sem significância estatística (tabela 2).



b



d

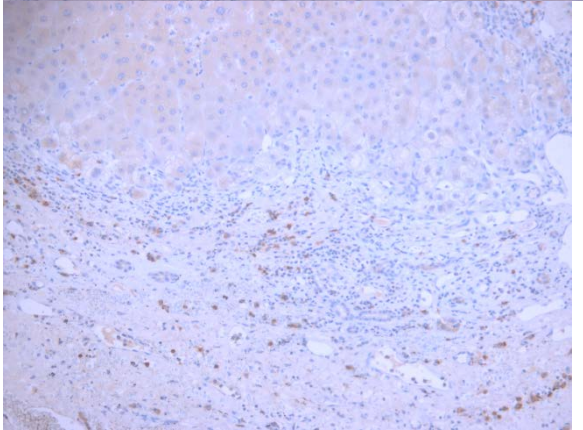
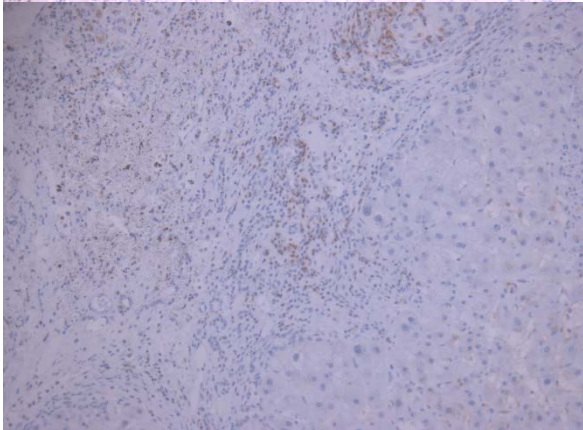


Fig. 9 Cirrose associada à hepatopatia alcoólica com marcada hepatite de interface, 200X. a) hematoxilina /eosina, b) CD8, c) CD4, d) CD20

O componente linfocitário T-CD8<sup>+</sup> na hepatite de interface, apesar de estar presente em todos os casos de C-VHC (Fig. 8) e em 23 dos 24 casos de C-HA (Figs. 9 e 10), mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,008$ ) quanto à intensidade. Foi mais intenso nas C-VHC (tabela 2).

O componente linfocitário T-CD4<sup>+</sup> na hepatite de interface também mostrou diferenças, estando significativamente ausente em 20,8% dos casos de C-HA ( $p < 0,014$ ) (tabela 2).

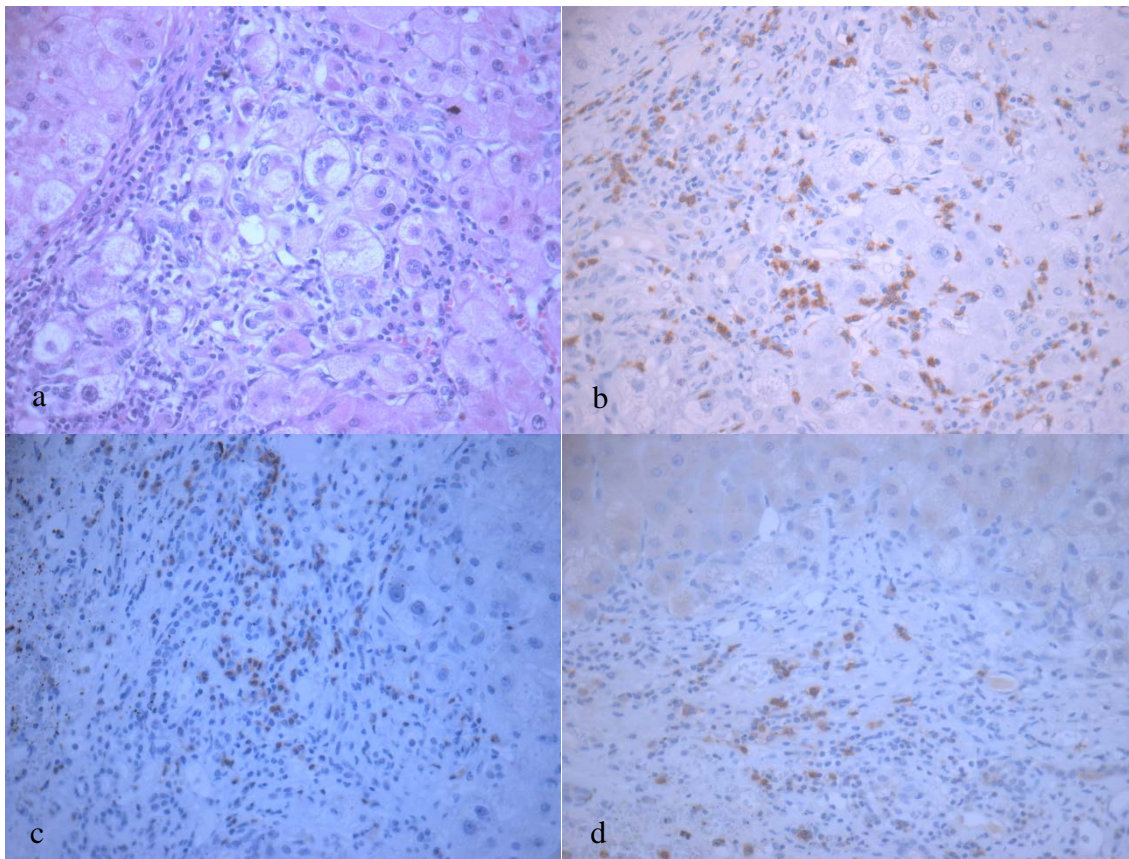


Fig. 10 Cirrose associada à hepatopatia alcoólica com marcada hepatite de interface, 400X. a) hematoxilina /eosina, b) CD8, c) CD4, d) CD20.



O componente linfocitário B-CD20<sup>+</sup> na hepatite de interface (Fig. 11) também diferiu significativamente ( $p < 0,001$ ), com maior intensidade nos casos de C-HA (tabela 2).

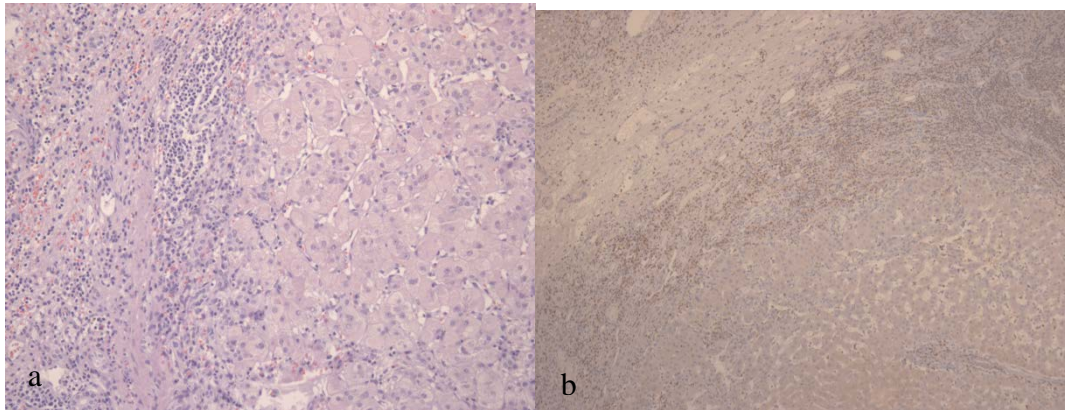


Fig. 11 hepatite de interface com intenso componente CD20<sup>+</sup> em C-HA  
a) HE b) CD20.

Tabela 1 – Comparação entre as populações linfocitárias septais nas cirroses associadas ao álcool e ao vírus C

| Variáveis                            | VHC         | Álcool     | p*     |
|--------------------------------------|-------------|------------|--------|
|                                      | (n=40)      | (n=34)     |        |
|                                      | n (%)       | n (%)      |        |
| <b>Hematoxilina/Eosina</b>           |             |            |        |
| Ausentes                             | 0 (0,0)     | 1 (2,9)    | 0,073  |
| Infiltrado Focal                     | 16 (40,0)   | 21 (61,8)  |        |
| Infiltrado Difuso                    | 24 (60,0)   | 12 (35,3)  |        |
| <b>Linfócitos T CD8<sup>+</sup></b>  |             |            |        |
| Ausentes                             | 0 (0,0)     | 2 (5,9)    | 0,046  |
| Infiltrado Focal                     | 24 (60,0)   | 26 (76,5)  |        |
| Infiltrado Difuso                    | 16 (40,0)** | 6 (17,6)   |        |
| <b>Linfócitos T CD4<sup>+</sup></b>  |             |            |        |
| Ausentes                             | 0 (0,0)     | 7 (20,6)** | 0,002  |
| Infiltrado Focal                     | 32 (80,0)   | 26 (76,5)  |        |
| Infiltrado Difuso                    | 8 (20,0)**  | 1 (2,9)    |        |
| <b>Linfócitos B CD20<sup>+</sup></b> |             |            |        |
| Ausentes                             | 0 (0,0)     | 0 (0,0)    | 0,225  |
| Focal                                | 32 (80,0)   | 22 (64,7)  |        |
| Difuso                               | 8 (20,0)    | 12 (35,3)  |        |
| <b>Folículos linfóides</b>           |             |            |        |
| Presentes                            | 16 (40,0)   | 30 (88,2)  | <0,001 |
| Ausentes                             | 24 (60,0)   | 4 (11,8)   |        |

\* teste qui-quadrado de Pearson

\*\* diferença significativa através do teste dos resíduos ajustados (p<0,05)

Tabela 2 – Comparação entre as populações linfocitárias na hepatite de interface (necrose em sacabocado) nas cirroses associadas ao álcool e ao vírus C

| Variáveis                                      | VHC         | Álcool      | p*     |
|--|-------------|-------------|--------|
|  | (n=40)      | (n=34)      |        |
|  | n (%)       | n (%)       |        |
| Hepatite de interface<br>(Hematoxilina/Eosina) |             |             |        |
| Presente                                       | 36 (90,0)   | 24 (70,6)   | 0,068  |
| Ausente  | 4 (10,0)    | 10 (29,4)   |        |
|  | n=36        | n=24        |        |
| Linfócitos CD8 <sup>+</sup>                    |             |             |        |
| Ausentes                                       | 0 (0,0)     | 1 (4,2)     | 0,008  |
| Infiltrado leve                                | 4 (11,1)    | 10 (41,7)** |        |
| Infiltrado intenso                             | 32 (88,9)** | 13 (54,2)   |        |
| Linfócitos CD4 <sup>+</sup>                    |             |             |        |
| Ausente  | 0 (0,0)     | 5 (20,8)**  | 0,014  |
| Infiltrado leve                                | 28 (77,8)   | 16 (66,7)   |        |
| Infiltrado intenso                             | 8 (22,2)    | 3 (12,5)    |        |
| Linfócitos CD20 <sup>+</sup>                   |             |             |        |
| Ausentes                                       | 20 (55,6)** | 3 (12,5)    | <0,001 |
| Infiltrado leve                                | 12 (33,3)   | 3 (12,5)    |        |
| Infiltrado intenso                             | 4 (11,1)    | 18 (75,0)** |        |

\* teste qui-quadrado de Pearson

\*\* diferença significativa através do teste dos resíduos ajustados (p<0,05)

As C-HA apresentaram um quadro caracterizado pela presença de infiltrado linfocitário septal difuso em 21/40 (61,8%) casos, com linfócitos T-CD8<sup>+</sup> de distribuição predominantemente focal em 26/34 (76,5%), linfócitos T-CD4<sup>+</sup> de distribuição predominantemente focal em 26/34 (76,5%), linfócitos B-CD20<sup>+</sup> de distribuição predominantemente focal em 22/34 (64,7%) e folículos linfóides presentes em 30/34 (88,2%) . Quanto à hepatite de interface, as características apresentadas pelas C-HA foram necrose em sacabocado presente em 24/34 (70,6%), com componente linfocitário T-CD8<sup>+</sup> de padrão intenso em 13/24 (54,2%), componente linfocitário T-CD4<sup>+</sup> de padrão leve em 16/24 (66,7%) e componente linfocitário B-CD20<sup>+</sup> de padrão intenso em 18/24 (75%) casos.

As C-VHC apresentaram um quadro caracterizado pela presença de infiltrado linfocitário septal em 40/40 (100%), sendo 24/40 (60%) de padrão difuso, com linfócitos T-CD8<sup>+</sup> de distribuição predominantemente focal em 24/40 (60%) casos, linfócitos T-CD4<sup>+</sup> de distribuição predominantemente focal em 32/40 (80%) casos, linfócitos B-CD20<sup>+</sup> de distribuição predominantemente focal em 32/40 (80%) casos e presença de folículos linfóides em apenas 16/40 (40%). Quanto à hepatite de interface, as características apresentadas pela C-VHC foram hepatite de interface presente em 36/40 (90%), com componente linfocitário T-CD8<sup>+</sup> de padrão intenso em 32/36 (88,9%) casos, componente linfocitário T-CD4<sup>+</sup> de padrão leve em 28/36 (77,8%) casos, enquanto o componente linfocitário B-CD20<sup>+</sup> foi ausente em 20/34 (55,6%) dos casos.

As diferenças significativas entre as C-VHC e as C-HA foram as seguintes:

- (a) C-VHC: infiltrado septal difuso de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>, com intenso componente T-CD8<sup>+</sup> na hepatite de interface.
- (b) C-HA: infiltrado septal focal com folículos linfóides, com intenso componente B-CD20<sup>+</sup> na hepatite de interface.

## 5. Discussão

Os achados histológicos (infiltrado linfocitário septal e hepatite de interface) e imunoistoquímicos (presença de linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, T-CD8<sup>+</sup> e B-CD20<sup>+</sup>) do grupo C-VHC foram idênticos aos descritos na literatura<sup>(83,86,87,88,89,90,91,92,93,94)</sup>.

A seleção de explantes hepáticos provenientes de pacientes com cirrose alcoólica e longo período de abstinência, sem esteatose significativa e sem esteato-hepatite ao exame histológico, nos permite afastar a ação direta do álcool e a ação da resposta inflamatória inata mediada pelas endotoxinas/lipopolissacárides.

Neste contexto, o exame das preparações histológicas coradas pela técnica tradicional de hematoxilina e eosina não mostrou diferenças entre o grupo de C-HA e o grupo C-VHC. O infiltrado linfocitário septal apresentou tendência de um padrão difuso em 60% das C-VHC e padrão focal em 61,8% das C-HA. Não houve diferença significativa quanto à hepatite de interface (necrose em sacabocado). Ela foi identificada em 90% das C-VHC e em 70,6% das C-HA.

Na bibliografia das décadas de 70 e 80 encontramos autores que descrevem a presença de necrose em sacabocado nas hepatites alcoólicas<sup>(48,49,50,51,52,53)</sup>. Como neste período não havia a possibilidade do diagnóstico sorológico de hepatite viral C, este viés não pode ser afastado, e estas alterações ficaram sob suspeita de uma possível sobreposição das duas entidades.

Colombat e colaboradores em publicação de 2002<sup>(5)</sup>, realizaram um trabalho retrospectivo no qual estudaram 200 pacientes com hepatopatia alcoólica e sorologia negativa para o VHC. Nele identificaram infiltrado linfocitário portal ou septal em 40% e hepatite de interface em 15% dos casos

estudados. Nosso estudo encontrou infiltrado linfocitário septal em 97,1%, sendo focal em 61,8% e difuso 35,3%, enquanto a hepatite de interface atingiu 70,6%. Estes valores maiores são explicados pelo fato de que enquanto Colombat e colaboradores examinaram biópsias hepáticas, nós examinamos explantes hepáticos com uma amostragem muito mais ampla.

Na avaliação do infiltrado septal C-VHC encontramos componente T-CD8<sup>+</sup> no mostrou uma diferença significativa. Apesar de em ambos os grupos a maioria dos casos apresentarem um padrão focal, um grupo significativo (40%) das C-VHC mostrou um padrão difuso ( $p < 0,046$ ). O componente T-CD4<sup>+</sup> mostrou um achado semelhante com predomínio de padrão focal em ambos os grupos. No entanto, houve um subgrupo significativo da C-HA (20,6%) no qual o componente CD4<sup>+</sup> estava ausente. Igualmente significativo, um subgrupo da C-VHC apresentou padrão difuso (20%).

O componente septal B-CD20<sup>+</sup> distribuiu-se entre os dois grupos de forma similar, com predomínio do padrão focal. Curiosamente a presença de folículos linfóides foi significativamente mais freqüente na C-HA ( $p < 0,001$ ). Este achado provavelmente está relacionado com a produção de auto-anticorpos circulantes, hipergamaglobulinemia e anticorpos contra antígenos hepatocitários já descritos<sup>(60)</sup>.

Considerando que os explantes hepáticos utilizados neste estudo provêm de pacientes em abstinência alcoólica de longa duração é lógico pensarmos que as lesões hepáticas identificadas, não são uma ação direta do etanol, nem são devidas ao aporte de endotoxinas/lipopolissacárides provenientes da circulação portal. Conseqüentemente, não podem ser explicadas pela ação direta do acetaldeído e de seus metabólitos sobre as mitocôndrias hepáticas, nem pela resposta inflamatória inata mediada pelas células de Kupffer na presença de lipopolissacárides.

A possibilidade de uma terceira rota patogênica deve ser considerada e é reforçada pelo padrão morfológico identificado, constituído por linfócitos T-CD4<sup>+</sup>, T-CD8<sup>+</sup> e B-CD20<sup>+</sup> que revelam a participação da resposta inflamatória adquirida do tipo celular e do tipo humoral na lesão dos hepatócitos.

Concluindo, os nossos achados reforçam a hipótese descrita na literatura recente<sup>(46,60,70,71,72,73)</sup> de um terceiro mecanismo patogênico no desenvolvimento da cirrose alcoólica. Este mecanismo corresponderia a uma agressão autoimune contra prováveis neoantígenos desenvolvidos nas fases iniciais da hepatopatia alcoólica. Alguns neoantígenos já têm sido identificados como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e do malondialdeído (MDA)<sup>(15,18,23,24)</sup> e merecem estudos mais amplos.

A hipótese de uma agressão autoimune explicaria o porquê da progressão da cirrose alcoólica em pacientes em abstinência. Também explicaria o alargamento fibroso portal identificado nas hepatopatias alcoólicas.

## 6. Conclusões

A presença de hepatite de interface caracteristicamente identificada nas cirroses associadas ao VHC, também ocorre nas cirroses associadas à hepatopatia alcoólica.

A análise de preparações histológicas coradas pela técnica de HE não permite o diagnóstico diferencial conclusivo entre as C-HA e as C-VHC.

A análise imunoistoquímica mostra um componente septal e perisseptal de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup> significativamente mais intenso nas C-VHC e um componente B-CD20<sup>+</sup> significativamente mais intenso nas C-HA.

Em uma parcela dos pacientes com C-HA a hepatite de interface contém denso infiltrado linfocitário T-CD8<sup>+</sup> e T-CD4<sup>+</sup> o que sugere fortemente a participação da resposta inflamatória adquirida, do tipo celular, na patogênese da cirrose alcoólica. Este achado tem sido registrado na literatura médica em humanos e em animais de experimentação, mas sempre dentro do contexto de esteato-hepatite com exposição ao etanol. Os modelos destes estudos implicam na concomitância de uma agressão direta do álcool sobre os hepatócitos, de uma resposta inflamatória inata desencadeada pelo aporte de lipopolissacárides de origem intestinal e de uma resposta inflamatória adquirida provavelmente dirigida contra neoantígenos. O modelo por nós estudado, na medida em que afasta a ação dos dois primeiros mecanismos, constitui um modelo promissor para o estudo da resposta inflamatória adquirida na patogênese da hepatopatia alcoólica humana.



## 7. Bibliografia

1. Carlini EA Epidemiologia do uso do álcool no Brasil. Arq Med ABC 2006; 2:4-7
2. Arteel G, Mendez C, Bentley F et al Advances in alcoholic liver disease. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 2003; 17(4):625-647
3. Bellentani S, Saccocio G, Costa G et al Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. Gut 1997; 41:845-850
4. Hall, PM Pathogenesis of alcoholic liver disease, in MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ et al: Pathology of the Liver. London. England. Churchill Livingstone 2007, pp327-355.
5. Teli MR, Day CP, Burt AD et al Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. Lancet 1995; 346:987-990
6. Dam-Larsen S, Franzmann MB, Christoffersen P et al Histological characteristics and prognosis in patients with fatty liver. Scand J Gastroenterol 2005; 40:460-467
7. Day CP, James OFW Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 1998; 114:842-845
8. Geller SA, Petrovic LM Alcoholic liver disease, in Geller SA, Petrovic LM Biopsy interpretation of the liver. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2004, pp134-146
9. Scheuer PJ, Lefkowitz JH Steatosis and Steatohepatitis, in Scheuer PJ, Lefkowitz JH Liver biopsy interpretation, seventh edition, Elsevier Saunders, 2006, pp105-120
10. Sozio M, Carbb DW Alcohol and lipid metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008; 295:E10-E16

11. Purohit V, Gao, B, Song, BJ Molecular Mechanisms of Alcoholic Fatty Liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(2):191-205.
12. Liber CS Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years. A review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23:991-1007
13. Kono H, Rusyn I, Yin M et al NADPH oxidase-derived free radical are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106:867-872
14. Bailey SM, Cunningham CC Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:11-16
15. Aleynic SI, Lieber CS Polyenylphosphatidylcholine corrects the alcohol-induced hepatic oxidative stress by restoring S-adenosylmethionine. *Alcohol* 2003 ;38:208-212
16. Valério LG, Parks T, Petersen DR Alcohol mediates increases in hepatic and serum nonheme iron stores in rat model for alcohol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:1352-1361
17. Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB et al Differential contributions of C3, C5, and decay accelerating factor to ethanol-induced fatty liver mice. *Gastroenterology* 2007; 132:1117-1126
18. Bykov I, Junnikkala S, Pekna M et al Complement C3 contributes to ethanol-induced liver steatosis in mice. *Ann Med* 2006; 38:280-286
19. Ishii H, Adachi M, Fernandez-Checa JC et al Role of apoptosis in alcoholic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27:1207-1212
20. Gillis SE, Nagy LE Deposition of cellular fibronectin increases before stellate cell activation in rat during ethanol feeding. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21:857-861
21. He J, de la Monte S, Wands JR Acute ethanol exposure inhibits signaling in the liver. *Hepatology* 2007; 46:1791-1800
22. Bergheim I, Guo L, Davis MA Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: Critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology* 2006; 130:2099-2112
23. Sampey BP, Korourian S, Ronis MJ et al Immunohistochemical characterization of hepatic malondialdehyde and 4-

- hydroxynonenal modified proteins during early stages of ethanol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27:1015-1022
24. Sampey BP, Stewart BJ, Petersen DR Ethanol-induced modulation of hepatocellular extracellular signal-regulated kinase-1/2 activity via 4-hydroxynonenal. *J Biol Chem* 2007; 282:1925-1937
  25. Nath B, Szabo G Alcohol-induced modulation of signaling pathways in liver parenchymal and nonparenchymal cells: implications for immunity. *Seminars in Liver Disease* 2009; 29(2):166-177
  26. Wan YJ, Morimoto M, Thurman RG et al Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gene is decreased in experimental alcoholic liver disease. *Life Sci* 1995; 56:307-317
  27. Tanaka F, Shiratori Y, Yokosuka O et al Polymorphism of alcohol-metabolizing genes affects drinking behavior and alcoholic liver in Japanese men. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21:596-601
  28. Chao YC, Yong TH, Tang HS et al Alcoholism and alcoholic organ damage and genetic polymorphism of alcohol metabolizing enzymes in Chinese patients. *Hepatology* 1997; 25:112-117
  29. Enomoto N, Takase S, Takada N et al Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes. *Hepatology* 1991; 13:1071-1075
  30. Grove J, Brown AS, Daly AK et al The RsaI polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasian: effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype. *Pharmacogenetics* 1998; 8:335-342
  31. French SW The Mallory body: structure, composition and pathogenesis. *Hepatology* 1981; 1:76-83
  32. Hoek JB, Pastorino JG Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27: 63-68
  33. Syn WK, Teaberry V, Choi SS et al Similarities and differences in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* 2009; 29(2); 200-210.

34. Cohen JA, Kaplan MM The SGOT/SGPT ratio – an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979; 95:835-838
35. Geller SA, Petrovic LM Alcoholic Liver Disease, in Geller SA, Petrovic LM: *Biopsy Interpretation of the Liver*. Philadelphia. Lippincott, Williams & Wilkins, 2004, pp 134-149.
36. Rao RK, Sheth A, Sheth P Recent advances in alcoholic liver disease. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G881-G884
37. Ikejima K, Enomoto M, Iimuro Y et al Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells. *Am J Physiol* 1998; 274:G669-G676
38. Thurman, RG Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 275:G605-G611
39. Stern M, Carter EA, Walter WA Food protein and gut mucosal barrier. Effects of acute and chronic ethanol administration on handling and uptake of bovine serum albumin by rat small intestine. *Dig Dis Sci* 1986; 31:1242-1248
40. Parlesak A, Schaefer C, Schutz et al Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000; 32:742-747
41. Fukui H, Brauner B, Bode J et al Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 1991; 12:192-169
42. Bode C, Kugler V, Bode JC Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* 1987; 4:8-14
43. Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SMH Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease: correlation with plasma endotoxina, prostaglandin E2, leukotriene B4 and thromboxane B2. *Am J Pathol* 1993; 142:367-373

44. Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P Pattern recognition receptors. *Hepatology* 2006; 44:287-298
45. Seki E, Brenner DA TLRs and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48:322-335
46. Mandrekar P, Szabo, G Sinalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *Journal of Hepatology* 2009; 50:1258-1266
47. Colantoni A, Idilman R, De Maria N et al Hepatic apoptosis and proliferation in male and female rats fed alcohol: role of cytokinas. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27:1184-1189
48. Goldberg SJ, Mendenhall CL, Conell AM et al "Non-alcoholic" chronic hepatitis in the alcoholic. *Gastroenterology* 1977; 72:598-604.
49. Hodges JR, Millward-Sadler GH, Wright R. Chronic active hepatitis: the spectrum of disease. *Lancet* 1982; i:550-552.
50. Crapper RM, Bhathal PS, Mackay IR Chronic active hepatitis in alcoholic patients. *Liver* 1983; 3:327-337.
51. Ni J, Matsuda Y, Tanaka A Chronic hepatitis induced by alcohol. *Dig. Sis Sci* 1983; 28: 207-215.
52. Brillanti S, Barbara L, Miglioli F. Hepatitis C virus: a possible cause of chronic hepatitis in alcoholics. *Lancet* 1989; ii:1390-1391.
53. Lampertico, P, Colombo M, Rumi MG et al Hepatitis C virus (HCV)-related chronic hepatitis in Italian alcoholic patients. *Hepatology* 1991; 14: 654 (abstr).
54. Colombat M, Charlotte F, Ratziu V et al Portal lymphocytic Infiltrate in alcoholic liver disease. *Human Pathology* 2002; 33:1170-1174
55. Batista A, Bianchi L, DeGroote J et al The diagnostic significance of periportal hepatic necrosis and inflammation. *Histopathology* 1988; 12:569-579
56. Kerr JFR, Cooksley WGE, Searle J et al The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet* 1979; ii:827-828

57. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC et al Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with clearance in acute hepatitis C. *J. infect. Dis.* 2000; 181:1528-1536
58. Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE et al Cell-mediated hepatic injury in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1993; 105:254-266
59. Haydon G, Lalor PF, Hubscher SG et al Lymphocyte recruitment to the liver in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27(1): 29-36
60. Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW Immunologic mechanisms of alcoholic liver injury. *Seminars in Liver Disease* 24: 273-287, 2004.
61. Manns M, Meyer KH, Hess G Autoantibodies against liver-specific membrane lipoprotein in acute and chronic liver disease: studies on organ, species, and disease specificity. *Gut* 1980; 21:955-961
62. Perperas A, Tsantoulas D, Portmann B et al Autoimmunity to a liver membrane lipoprotein and liver damage in alcoholic liver disease. *Gut* 1981; 22:149-152
63. Vidali M, Stewart SF, Rolla R et al Genetic and epigenetic factors in autoimmune reactions toward cytochrome P450E1 in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 410-419
64. Thiele GM, Tuma DJ, Willis Ms et al Soluble protein modified with acetaldehyde and malonaldehyde are immunogenic in the absence of adjuvant. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22:1731-1739
65. Klasse LW, Thiele GM Immune reactivity to proteins biotransformed by alcohol metabolites. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22(Suppl 5):204S-207S
66. Lemmers A, Moreno C, Gustot T et al The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 49:646-657
67. Berttelli E, Korn T, Oukka M et al Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature* 2008; 453:1051-1057

68. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28:454-467
69. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S et al Th17 cells in human disease. *Immunol Res* 2008; 223:87-113
70. Albano E Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Rad Biol Med* 2002; 32(2):110-114
71. Vidali M, Stewart SF, Albano E Interplay between oxidative stress and immunity in progression of alcohol-mediated liver injury. *Trends Mol Med* 2008; 14(2):63-71
72. Albano E Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Mol Asp Med* 2008; 29:9-16
73. Albano E, Vidali M Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr* 2009; Oct 7 (Epub ahead of print)
74. Bowen DG, Walker MW Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436:946-952
75. Bowen DG, Walker MW The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C? *J Hepatol* 2005; 42:408-417
76. Scheuer PJ, Lefkowitz Chronic hepatitis C. In: Scheuer PJ, Lefkowitz Liver Biopsy Interpretation. Elsevier Saunders, London, 2006, pp155-158
77. Theise ND, Bodenheimer HC, Ferrell LD Acute and chronic viral hepatitis. In: MacSween's Pathology of the Liver. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2007, pp 428-432
78. Ibuki N, Yamamoto K, Yabushita K In situ expression of granzyme B and Fas-ligand in the liver of viral hepatitis. *Liver* 2002; 22:198-204
79. Farci P et al Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; 258:135-140
80. Lai M et al Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 1994; 343:388-390

81. Takaki A et al Cellular immune response persist and humoral decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature* 2000; 6:578-582
82. Shoukry NH et al Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003; 197:1645-1655
83. Lechner F, Wong DK, Dumbar PR et al Analysis of successful immune response in person infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191:1499-1512
84. Cooper S et al Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10:433-449
85. Lechner F, Grakoui A et al HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302:659-662
86. Northfield JW, Kasprowicz V, Lucas M et al CD161 Expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation. *Hepatology* 2008; 47(2):396-406
87. Lucas M, Vargas-Cuero AL, Lauer GM et al Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; 172:1744-1753
88. Appay V, Dumbar PR, Callan M et al Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infection. *Nat Med* 2002; 53:3-12
89. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V et al Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362:2095-2010
90. Bowen DG, Walter CM Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005; 436:946-952
91. Lauer GM, Lucas M, Timm J et al Full-breadth analysis of CD8<sup>+</sup> T cell responses in acute C virus infection and early therapy. *J Virol* 2005; 79:12979-12988
92. Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM et al Comprehensive analyses of CD8<sup>+</sup> T cell responses during longitudinal study of acute hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42:104-112



93. Sallusto F, Lenig D, Forster R et al Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-712
94. Northfield JW, Harcourt G, Lucas M et al Immunology of viral co-infection with HIV. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53:3-12
95. Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G 4-Hydroxynonenal-protein adducts: a reliable biomarker of lipid oxidation in liver disease. *Mol Asp Med* 2008; 29:67-71



**Projeto: CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA SEPTAL E PERISSEPTAL NAS CIRROSES SECUNDÁRIAS À HEPATOPATIA ALCOÓLICA.**

**Anexo 2**

**Ficha de coleta de dados histológicos e imunoistoquímicos**

Caso N<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

**INFILTRADO LINFOCITÁRIO SEPTAL**

HE ( ) ausente ( ) focal ( ) difuso

CD8 ( ) ausente ( ) focal ( ) difuso

CD4 ( ) ausente ( ) focal ( ) difuso

CD20 ( ) ausente ( ) focal ( ) difuso

Folículos linfóides ( ) ausentes ( ) presentes

**HEPATITE DE INTERFACE (NECROSE EM SACABOCADO)**

( ) ausente

( ) presente com componente

CD8 ( ) ausente ( ) leve ( ) intenso

CD4 ( ) ausente ( ) leve ( ) intenso

CD20 ( ) ausente ( ) leve ( ) intenso

\*leve = focal em muitas ou poucas zonas periportais

\*\* intenso = em "placa" em muitas ou poucas zonas periportais

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_