

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Jésus Faria Rosa Júnior

**Sistema de Classificação Histológica de Nakanuma em uma coorte brasileira:
associações clínicas e bioquímicas na Colangite Biliar Primária e na Colangite
Esclerosante Primária**

Belo Horizonte
2023

Jésus Faria Rosa Júnior

**Sistema de Classificação Histológica de Nakanuma em uma coorte brasileira:
associações clínicas e bioquímicas na Colangite Biliar Primária e na Colangite
Esclerosante Primária**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Paula Vieira Teixeira Vidigal
Coorientadora: Cláudia Alves Couto

Belo Horizonte
2023

R788s Rosa Júnior, Jésus Faria.
Sistema de Classificação Histológica de Nakanuma em uma coorte brasileira [recursos eletrônicos]: associações clínicas e bioquímicas na Colangite Biliar Primária e na Colangite Esclerosante Primária. / Jésus Faria Rosa Júnior. - - Belo Horizonte: 2023.
54f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Paula Vieira Teixeira Vidigal.
Coorientador (a): Cláudia Alves Couto.
Área de concentração: Anatomia Patológica e Medicina Legal.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cirrose Hepática Biliar. 2. Colangite Esclerosante. 3. Perfil de Saúde. 4. Gastroenterologia. 5. Dissertação Acadêmica. I. Vidigal, Paula Vieira Teixeira. II. Couto, Cláudia Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 725

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Sistema de Classificação Histológica de Nakanuma em uma coorte brasileira: correlações clínicas e bioquímicas na Colangite Biliar Primária e na Colangite Esclerosante Primária”

JÉSIUS FARIA ROSA JUNIOR

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 20 de dezembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Claudia Alves Couto, Faculdade de Medicina/UFMG

Profa. Dra. Luciana Costa Faria, Faculdade de Medicina/UFMG

Profa. Larissa Bastos Eloy da Costa, UNICAMP

Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal, FM/UFMG – ORIENTADORA

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Professora do Magistério Superior**, em 29/01/2024, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Costa Faria, Professora do Magistério Superior**, em 30/01/2024, às 07:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Bastos Eloy da Costa, Usuária Externa**, em 30/01/2024, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Alves Couto, Professora do Magistério Superior**, em 06/03/2024, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2969135** e o código CRC **D13D65F1**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 471 DE JÉSUS FARIA ROSA JUNIOR

Realizou-se, no dia 20 de dezembro de 2023, às 8:30 horas, sala 062, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada **“Sistema de Classificação Histológica de Nakanuma em uma coorte brasileira: correlações clínicas e bioquímicas na Colangite Biliar Primária e na Colangite Esclerosante Primária”**, apresentada por **Jésus Faria Rosa Junior**, número de registro 2021700776, graduado no curso de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Claudia Alves Couto**, Faculdade de Medicina/UFMG; **Profa. Dra. Luciana Costa Faria**, Faculdade de Medicina/UFMG; **Profa. Larissa Bastos Eloy da Costa**, UNICAMP; **Profa. Paula Vieira Teixeira Vidigal**, Faculdade de Medicina/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Dissertação:

(X) APROVADO

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2023.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.**



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal**, Professora do Magistério Superior, em 29/01/2024, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Costa Faria**, Professora do Magistério Superior, em 30/01/2024, às 07:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Bastos Eloy da Costa**, Usuária Externa, em 30/01/2024, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Alves Couto**, Professora do Magistério Superior, em 06/03/2024, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2969134** e o código CRC **5DD3EF1C**.

Referência: Processo nº 23072.278301/2023-01

SEI nº 2969134

Dedico este trabalho ao Leon, por todos esses anos e companheirismo, e aos meus pais, Alice e Jésus, que tanto sacrificaram.

AGRADECIMENTOS

Ao Leon e aos nossos gatos, Wendy, Morgana, Medivh, Minerva e T'challa, que tornam meus dias melhores e nosso lar, um santuário. Aos meus pais, Alice e Jésus, cujos esforços para chegar onde estou nunca foram medidos. Se dou agora mais esse passo, é graças a vocês que estiveram comigo por todo o trajeto, me apoiando e não me deixando cair!

Agradeço às professoras Paula e Claudia pela oportunidade de realizar este trabalho, por me orientarem e me permitirem crescer, mesmo quando os desafios pareciam intransponíveis. Aos professores do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal que sempre me abraçaram desde a graduação. À professora Mônica e ao Dr. Guilherme, cuja ajuda nunca será esquecida e serei eternamente grato. Admiro cada um de vocês!

Aos colegas da Residência Médica em Patologia do HC-UFMG, Gustavo, Túlio, Bruna Aparecida, Amanda, Bruna Bertoni, Letícia, Ruana, Matheus e, claro, a melhor R= que poderia ter, Laura. Vocês tornaram esses últimos anos incríveis a despeito das inúmeras adversidades. Carregarei sempre no coração cada um de vocês! Contem comigo sempre — na Patologia e fora dela.

Meus sinceros agradecimentos ao Moisés, um grande mestre e professor, à dona Merian e ao CEAP por todas as oportunidades. Aos meus amigos e fiéis escudeiros, Eduardo, Sofia, Léo e Delano, que mesmo à distância, são sempre essenciais para mim!

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, universidade pública que sempre me deu condição de alcançar os meus sonhos, e aos pacientes — embora nos “bastidores”, seguem sendo o foco ao qual jurei.

“There is grandeur in this view of life
With its several powers, having been
Originally breathed into a few forms or into one
And that whilst this planet has gone cycling on
According to the fixed law of gravity,
from so simple
A beginning endless forms most beautiful
And most wonderful have been,
and are being, evolved.”

— Charles Darwin

RESUMO

Introdução: A Colangite Biliar Primária (CBP) e a Colangite Esclerosante Primária (CEP) são doenças hepáticas crônicas com perfis epidemiológicos distintos. Este estudo tem como objetivo avaliar a aplicação do sistema de escore de Nakanuma em biópsias hepáticas de uma coorte brasileira, explorando sua correlação com parâmetros clínicos e laboratoriais na CBP e na CEP.

Métodos: Este estudo retrospectivo incluiu 32 casos de CBP e 36 casos de CEP do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e outros serviços de hepatologia em Belo Horizonte, Brasil. As alterações histopatológicas em biópsias hepáticas foram avaliadas utilizando o Sistema de Classificação de Nakanuma. Foram analisados dados clínicos e laboratoriais, incluindo níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), associando-os com os parâmetros histológicos do sistema de Nakanuma.

Resultados: O grupo CBP era composto por 30 mulheres e 2 homens, com idade média de 58,2 anos. O grupo CEP era composto por 24 homens e 12 mulheres, com idade média de 35,7 anos. Nos pacientes com CEP, a atividade colangítica foi significativamente associada aos níveis séricos de AST e ALT. Nos pacientes com CBP, foi observada uma correlação significativa entre estágios histológicos mais elevados e aumento dos níveis séricos de FA. Os Estágios 3 e 4 de Nakanuma correlacionou-se com $FA > 1,67 \times$ limite superior da normalidade, indicando uma pior resposta clínica ao tratamento com ácido ursodesoxicólico, o que se alinha com o prognóstico a longo prazo segundo os Critérios de Toronto. No entanto, esses critérios não se mostraram significativos para a CEP em nosso estudo.

Conclusão: Nosso estudo revela uma associação notável entre o grau de atividade colangítica de Nakanuma e os níveis séricos de ALT e AST na CEP. Além disso, observamos uma correlação entre a FA sérica e o estágio histológico de Nakanuma, previamente associados com resposta ao tratamento e pior prognóstico. Esses achados ressaltam a utilidade do sistema de classificação de Nakanuma em fornecer informações sobre a progressão e o prognóstico da doença na população brasileira.

Palavras-chaves: colangite biliar primária, colangite esclerosante primária, histopatologia, classificação de Nakanuma.

ABSTRACT

Background: Primary Biliary Cholangitis (PBC) and Primary Sclerosing Cholangitis (PSC) are chronic liver diseases with distinct epidemiological profiles. This study aims to evaluate the application of the Nakanuma scoring system in a Brazilian cohort, exploring its correlation with clinical and laboratory parameters in PBC and PSC.

Methods: This retrospective study included 32 PBC cases and 36 PSC cases from the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais and other hepatology services in Belo Horizonte, Brazil. Histopathological changes were assessed using the Nakanuma's Classification System. Clinical and laboratory data, including serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP), were analyzed. Correlations between histological scores and clinical parameters were examined.

Results: The PBC group consisted of 30 women and 2 men, with an average age of 58.2 years. The PSC group comprised 24 men and 12 women, with an average age of 35.7 years. In PSC patients, cholangitic activity was significantly associated with AST and ALT serum levels. In PBC patients, a significant correlation was observed between higher histological stages and increased ALP serum levels. Nakanuma Stage 3 and 4 correlated with $ALP > 1,67 \times$ upper limit of normality, indicating a weaker clinical response to ursodeoxycholic acid treatment, which aligns with long-term prognosis as per the Toronto Criteria. However, these criteria did not hold significance for PSC in our study.

Conclusion: Our study reveals a noteworthy association between Nakanuma's grading of Cholangitis Activity and serum ALT and AST levels in PSC. Additionally, we observed a correlation between serum ALP and histological stage, both of which negatively scale with treatment response and, hence, long-term prognosis. These findings underscore the utility of the Nakanuma classification system in providing valuable insights into disease progression and prognosis in the Brazilian population.

Keywords: Primary biliary cholangitis, primary sclerosing cholangitis, histopathology, Nakanuma classification system.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMA	Anticorpo anti-mitocôndria
AST	Aspartato aminotransferase
AUDC	Ácido ursodesoxicólico
CBP	Colangite Biliar Primária
CD4	Linfócito T helper com receptor CD4
CD8	Linfócito T citotóxico com receptor CD8
CEP	Colangite Esclerosante Primária
CXCR3	Receptor de quimiocina 3
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E3BP	Dihidrolipoamida desidrogenase
FA	Fosfatase alcalina
FUT2	Proteína fucosiltransferase estabilizadora de glicocálice 2
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
MELD	Model for End-Stage Liver Disease
MELD	Model for End-stage Liver Disease
PAMPs	Padrões moleculares relacionados a patógenos
PDC	Complexo da piruvato desidrogenase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
RNA	Ácido ribonucleico
TLRs	Toll-like receptors
VAP1	Proteína de adesão vascular 1
pANCAs	Anticorpos anticitoplasma de neutrófilo atípicos perinucleares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
2.1	Biópsia hepática	13
2.2	Colangite biliar primária	13
2.2.1	Epidemiologia	13
2.2.2	Etiopatogênese da colangite biliar primária	14
2.2.3	Apresentação clínica e diagnóstico	15
2.2.4	Histologia	15
2.2.5	Tratamento	15
2.2.6	Fatores prognósticos	16
2.3	Colangite esclerosante primária	16
2.3.1	Epidemiologia	16
2.3.2	Etiopatogênese da colangite esclerosante primária	17
2.3.3	Apresentação clínica e diagnóstico	18
2.3.4	Histologia	18
2.3.5	Tratamento	19
2.3.6	Fatores prognósticos	19
2.4	Crítério de Toronto	20
2.5	Classificação histológica de Nakanuma	20
2.5.1	Antecedentes científicos	20
2.5.2	Classificação histológica de Nakanuma e validação	21
2.5.3	Sistemas de estadiamento histológico e colangite biliar primária (CEP)	22
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	Objetivos gerais	24
4.2	Objetivos específicos	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
	Referências	26

1 INTRODUÇÃO

A Colangite Biliar Primária (CBP), nomenclatura atual da antiga cirrose biliar primária, é uma doença hepática autoimune e rara, com grande variabilidade epidemiológica entre diferentes países. Afeta predominantemente mulheres de meia-idade, sendo seu marcador sorológico mais característico o anticorpo antimitocôndria (AMA), frequentemente associando-se com outras doenças autoimunes. Caracteriza-se pelo acometimento de ductos biliares intrahepáticos, culminando em cirrose, necessidade de transplante hepático e óbito. Clinicamente, seu tratamento de escolha é o ácido ursodesoxicólico (AUDC), que apresenta benefícios retardando a progressão da doença e aumentando a sobrevida^{1,2}.

A Colangite Esclerosante Primária (CEP) é outra doença hepática crônica, caracterizada por inflamação e fibrose dos ductos biliares, culminando em colestase e cirrose biliar. A etiologia precisa da CEP permanece elusiva, com provável etiologia multifatorial. Ao contrário da CBP, a CEP afeta ambos os sexos de maneira relativamente igual, com predomínio de homens, exibindo variações geográficas. Seu tratamento é desafiador, haja vista que, até o momento, não há uma droga comprovadamente eficaz em prevenir a progressão da doença. Dessa forma, a terapêutica mais eficaz é o transplante hepático, com elevadas taxas de recidiva da doença^{3,4}.

Mesmo que a biópsia hepática não seja obrigatória para diagnosticar CBP e CEP, é fundamental para identificar a síndrome de sobreposição, CBP negativa para AMA e CEP de ductos pequenos. A biópsia hepática também pode auxiliar no estadiamento da doença, orientando o tratamento e avaliando o prognóstico^{5,6}. O sistema de estadiamento de Ludwig é um método tradicional para a avaliação histológica na CBP, concentrando-se na progressão da destruição dos ductos biliares para a inflamação portal e, eventualmente, para a cirrose⁷. Por outro lado, enquanto o sistema de Scheuer também faz o estadiamento da CBP com base em parâmetros semelhantes, inclui características adicionais como fibrose e inflamação⁸. Apesar de sua abrangência maior, o sistema de Scheuer compartilha limitações semelhantes, incluindo subjetividade, concordância entre observadores, sobreposição de estádios e incorporação da atividade inflamatória da doença como parte do estádio^{9,10}.

O sistema de classificação histológica de Nakanuma visa abordar essas limitações, oferecendo uma estrutura mais abrangente para avaliar a CBP. Ele considera a perda de ductos, fibrose e colestase crônica como fatores de avaliação do estadiamento, juntamente com as atividades colangítica e hepatítica como graduação necroinflamatória¹¹. O sistema foi validado por pesquisas subsequentes e revisões do sistema, oferecendo uma abordagem mais refinada e confiável para a avaliação da doença¹². Anthony W. H. Chan et al. (2014)¹⁰ compararam esse sistema com os sistemas tradicionais de Scheuer e Ludwig, sendo evidenciado que, embora todos se correlacionassem com parâmetros prognósticos significativos, a Classificação de Nakanuma superou os anteriores. Já a aplicabilidade desse escore na CEP foi avaliada por Elisabeth M. G. De Vries et al. (2015)⁹, sendo detectada

uma forte associação entre o estágio de Nakanuma, sobrevida livre de transplante e tempo até o transplante hepático. A viabilidade da aplicação desse escore histológico na CEP foi subsequentemente validada em um estudo de coorte internacional europeia¹³.

No Brasil, faltam estudos para definição do perfil clínico-epidemiológico dessas doenças. Até o momento, não há estudos que avaliam a aplicabilidade da classificação histológica de Nakanuma na CBP ou CEP em pacientes brasileiros. Tendo em vista as variações regionais de apresentações e a morbimortalidade dessas doenças, explorar métodos propedêuticos que contribuam para o acompanhamento e manejo clínico desses pacientes é de suma importância.

2 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

2.1 Biópsia hepática

A biópsia hepática é um procedimento realizado há mais de um século, proposta inicialmente por Ehrlich para avaliação da quantidade de glicogênio em pacientes diabéticos e, em seguida, por Lucatello para drenagem de abscesso hepático. Contudo, sua aplicabilidade na avaliação morfológica só foi reconhecida após a publicação de Schüpfer na França em 1907, no contexto da cirrose hepática, ao passo que seu papel diagnóstico só foi reconhecido por Bingel na Alemanha em 1923. Com o advento da agulha Meghini, o procedimento foi impulsionado por permitir amostra suficiente para estudos complementares e análise sob a microscopia de luz^{14,15,16}. Desde então, novas técnicas surgiram, por vezes auxiliadas por exame de imagem, permitindo coleta adequada da amostra de forma mais segura, a exemplo da biópsia hepática percutânea¹⁷.

Apesar do surgimento de métodos propedêuticos não invasivos, como exames de sangue e novos métodos de imagem, a biópsia hepática continua sendo uma ferramenta valiosa e necessária quando informações clinicamente importantes sobre o diagnóstico, prognóstico ou tratamento de um paciente não podem ser obtidas por meios mais seguros¹⁸. Em hepatopatias crônicas, a avaliação histopatológica pode auxiliar através da realização de diagnósticos diferenciais com base em características específicas de cada entidade anatomoclínica, além de permitir a graduação e o estadiamento de doenças.⁵.

2.2 Colangite biliar primária

2.2.1 Epidemiologia

A epidemiologia da colangite biliar primária (CBP) é complexa e varia significativamente entre diferentes populações e regiões geográficas, sendo mais incidente e prevalente na América do Norte e menos na região Ásia-Pacífico, com exceção do Japão¹⁹. Estima-se que a prevalência e a incidência globais sejam 146 por milhão e 17,6 por milhão de pessoas/ano²⁰, com aumento progressivo nas últimas décadas²¹. Acomete predominantemente mulheres após os 40 anos, em uma proporção estimada de 10:1².

O perfil epidemiológico brasileiro ainda é pouco estudado, sobretudo se considerarmos o caráter miscigenado da população. Entretanto, as características clínicas são as mesmas observadas em caucasianos e asiáticos, mas com taxas inferiores de síndrome de sobreposição com hepatite autoimune²².

2.2.2 Etiopatogênese da colangite biliar primária

A etiopatogênese da CBP é complexa e multifatorial, compreendendo uma série de mecanismos imunológicos que atuam de forma sinérgica na destruição de ductos biliares, o que é determinado por fatores genéticos, epigenéticos e ambientais²³. O principal mecanismo reconhecido para o desenvolvimento da doença é a perda da tolerância ao antígeno leucocitário específico humano (HLA), especialmente o haplotipo HLA-DR*8, da subunidade E2 do complexo da piruvato desidrogenase (PDC-E2), levando ao reconhecimento por anticorpos antimitocondriais (AMA). A ligação do AMA ao epítipo da PDC-E2 e à proteína ligadora da dihidrolipoamida desidrogenase (E3BP) na membrana mitocondrial interna acarreta a formação de imunocomplexos e subsequente ativação imunológica^{24,25}.

A perda da imunotolerância leva ao recrutamento e à ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ e à redução de linfócitos T regulatórios em tratos portais, que acentuam o dano aos ductos biliares. Alguns estudos relataram o papel também de plasmócitos na patogênese da CBP, sendo o único parâmetro que se correlaciona com os títulos sorológicos de AMA²⁶. Entretanto, até 5% dos pacientes não possuem AMA, mas exibem características clinicopatológicas semelhantes aos pacientes AMA-positivos.²⁷

A atuação de fatores genéticos foi concebida pela concordância de 60% em gêmeos monozigóticos e em estudos populacionais, onde se demonstraram associações com o HLA^{28,23,28}. Em até 70% dos pacientes, há associações genéticas com doenças autoimunes extra-hepáticas, como tireoidite de Hashimoto, síndrome de Sjögren, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide².

O papel de fatores ambientais e de estilo de vida também têm sido estudados, inclusive com variações sintomatológicas e prognósticas²⁹. Questões socioeconômicas e sanitárias, exposição a poluentes ambientais, agentes infecciosos, tabagismo, drogas e estressores físicos/psicológicos parecem atuar em indivíduos geneticamente predispostos^{30,31}. A infecção do trato urinário por *Escherichia coli* foi apontada por alguns estudos como fator predisponente para CBP por mimetismo molecular entre PDC-E2 humano e bacteriano.³²

No âmbito epigenético, a análise genômica do perfil de metilação do DNA de gêmeos monozigóticos discordantes para CBP evidenciou diferenças em 51 de 60 genes mapeados. De particular interesse, observou-se a redução de citocinas Th2 e diferenças no perfil de metilação de células CD4 e CD8. A demetilação do promotor CXCR3 de linfócitos CD4 resultando em aumento da atividade dessas células e progressão da doença por ativação da via Th1²³. Alterações na expressão de 35 microRNAs envolvidos na proliferação celular, resposta ao dano e morte celular evidenciaram importantes associações entre lesão biliar e desregulação do sistema imune, podendo também explicar a maior prevalência em mulheres³⁰.

2.2.3 Apresentação clínica e diagnóstico

A CBP é uma doença insidiosa, caracterizada por início silencioso, no qual a única evidência é a detecção do AMA em 90-95% dos casos. Na fase assintomática, há elevação de fosfatase alcalina³³. Já na fase sintomática, observa-se prurido intenso e fadiga. Com a progressão da doença, em fase avançada, o paciente passa a apresentar icterícia, hipertensão portal, podendo evoluir para cirrose e insuficiência hepática crônica³⁴. Alguns pacientes apresentam como primeiro sintoma a icterícia, particularmente durante a gestação ou uso de determinadas drogas³⁵. Outras manifestações são xantelasmas e xantomas, associados à hiperlipidemia, além de osteoporose e deficiência de vitaminas lipossolúveis³⁶.

O diagnóstico deve ser feito conforme os critérios da American Association for the Study of Liver Diseases, apoiado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia, sendo necessários dois de pelo menos três critérios: (1) aumento persistente de fosfatase alcalina; (2) presença de AMA ou outro anticorpo específico da CBP (incluindo sp100 ou gp210, se AMA negativo); (3) biópsia hepática demonstrando colangite destrutiva não-suprativa e destruição de ductos interlobulares⁶. Dessa forma, a biópsia não é considerada fundamental e fica a critério do hepatologista, mas deve sempre ser realizada em casos AMA-negativos, na suspeita de sobreposição ou para diagnóstico diferencial com outras doenças hepáticas.

2.2.4 Histologia

A CBP é marcada por agressão e perda de ductos biliares intra-hepáticos, o que interfere no fluxo biliar e pode levar à cirrose biliar. A lesão inicial envolve danos aos ductos biliares septais e interlobulares, com infiltração de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos nos tratos portais³⁷. Granulomas epitelioides são comuns perto dos ductos afetados e podem ser frouxos ou bem formados³⁸. Com a evolução da doença, há fibrose progressiva e ductopenia, embora, menos comumente, possa ocorrer reação ductular proeminente. Além disso, frequentemente se observam alterações necroinflamatórias do parênquima hepatocitário, sobretudo sob a forma de hepatite de interface, um achado mais proeminente em CBP do que em CEP³⁷. Atividade inflamatória lobular é uma característica importante, podendo ser reconhecidas em estádios histológicos precoces³⁹. Concomitante, alterações de colestase crônica podem ser vistas através do acúmulo hepatocitário de grânulos de cobre, melhor evidenciados à coloração de orceína⁴⁰.

2.2.5 Tratamento

A primeira linha de tratamento para CBP é o uso de ácido ursodesoxicólico (AUDC), que demonstrou eficácia na progressão histológica e na melhoria da sobrevivência a longo prazo sem transplante de fígado. No entanto, até 40% dos pacientes com CBP podem apresentar uma resposta bioquímica subótima ao AUDC, aumentando o risco de progressão para

insuficiência hepática ou necessidade de transplante de fígado. Recentemente, terapias adicionais com fibratos ou ácido obeticolico em associação com AUDC mostraram melhorar ainda mais os marcadores bioquímicos de colestase. Além disso, a resposta ao AUDC pode ser avaliada de forma mais precoce, aos 6 meses, para permitir a introdução mais rápida de terapias de segunda linha, especialmente em pacientes com doença avançada ou níveis elevados de enzimas hepáticas no início do tratamento^{41,42,43}. O transplante hepático é uma opção viável para os estádios avançados da doença⁴⁴.

Atualmente, fármacos que atuam como ligantes de receptores nucleares específicos envolvidos no metabolismo de ácidos biliares têm se mostrado promissores. Estudos apontam para redução da inflamação e atenuação da fibrose, a exemplo dos agonistas farmacológicos do receptor X do farnesóide e dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos³⁰.

2.2.6 Fatores prognósticos

A avaliação do prognóstico em pacientes com CBP é crucial para o manejo clínico eficaz. Vários escores para avaliação da resposta bioquímica ao AUDC foram propostos, visando à identificação de pacientes que precisam terapia de segunda linha, a exemplo do escore de Mayo⁴⁵. Recentemente, foram propostos também os escores GLOBE e UK-PBC com base em grande coorte internacional, que apresentaram boa acurácia em prever a necessidade de transplante hepático e óbito. Destacam-se como fatores de mau prognóstico a fibrose (fator independente), ductopenia e ausência de resposta bioquímica ao AUDC^{46,47,48}. Outros fatores prognósticos reconhecidos são idade, contagem plaquetária, fibrose (detectada por métodos não invasivos, como a elastografia), estágio histológico e os níveis séricos de fosfatase alcalina, bilirrubina total e albumina^{49,50}.

2.3 Colangite esclerosante primária

2.3.1 Epidemiologia

A epidemiologia da colangite esclerosante primária (CEP) apresenta variações geográficas, tendo suas maiores incidências (0,9-1,3/100.000/ano) e prevalências (8,5-14,2/100.000) estimadas na América do Norte e norte da Europa^{51,52,53}. A doença predomina em homens (65-70%) e é mais comumente diagnosticada entre 30 e 40 anos de idade³, entretanto, pode acometer também a faixa etária pediátrica⁵⁴. Até 70% dos pacientes portadores de CEP, apresentam também doença inflamatória intestinal (DII), tipicamente retocolite ulcerativa, — e até 8% dos portadores de DII apresentam alterações radiográficas de CEP^{4,52,55,56}.

No Brasil, uma coorte de 210 pacientes demonstrou diferenças epidemiológicas em relação aos estudos em caucasianos. A proporção de homens acometidos em relação a mulheres foi menor e houve uma menor associação com DII. As mulheres apresentaram

maior idade ao diagnóstico e níveis de bilirrubina mais baixos; contudo, o sexo não alterou a sobrevida dos pacientes⁵⁷.

2.3.2 Etiopatogênese da colangite esclerosante primária

A etiopatogênese da CEP não é bem elucidada, mas parece envolver indivíduos geneticamente predispostos expostos a antígenos. A evidência do fator genético foi corroborada com base em relatos de casos em uma mesma família e reforçada por Bergquist et al. utilizando uma coorte suíça de pacientes portadores de CEP^{58,59}. A doença tem sido associada a variantes específicas do HLA, sobretudo HLA-B8, HLA-DRW52, HLA-DR3 e HLA-DR2^{60,23}. Além disso, estudos de associação genômica alargada identificaram múltiplos loci de risco, incluindo genes envolvidos na homeostase de ácidos biliares⁶¹.

Imunologicamente, a CEP é caracterizada por inflamação e fibrose progressiva dos ductos biliares. Estudos de biópsias hepáticas mostraram que a população linfocitária nos tratos portais é predominantemente T, o que é condizente com o papel dos HLA e, por conseguinte, da imunidade adaptativa na doença^{62,23}. Há evidências de que o epitélio biliar recruta e regule a atividade das células T, sensibilizando-as através da ligação ao CD44⁶³. Paralelamente, linfócitos T da mucosa intestinal podem ser recrutados para o fígado através da circulação êntero-hepática, através da expressão da quimiocina CCL25 em células endoteliais hepáticas, induzindo um “homing” linfocitário aberrante⁶⁴. Mediante inflamação crônica, o endotélio passa a secretar proteína de adesão vascular 1 (vascular adhesion protein, *VAP1*), induzindo a expressão de MAdCAM1, que, por sua vez, leva à adesão desses linfócitos no espaço intravascular e subsequente saída para os tratos portais⁶⁵. Neutrófilos e macrófagos também podem participar da inflamação, o último contribuindo para perpetuação da inflamação crônica e fibrose através da secreção de TGF- β ⁶⁶.

O caráter autoimune da agressão a ductos biliares tem sido questionado, à medida que a CEP predomina em homens e possui pouca resposta a tratamentos imunossupressores. Contudo, anticorpos anticitoplasma de neutrófilo atípicos perinucleares (pANCAs) estão presentes no soro em até 88% dos casos, assim como na hepatite autoimune (50-96%) e retocolite ulcerativa (60-87%)⁶⁷. O reconhecimento da isoforma 5 da tubulina β por pANCAs em neutrófilos humanos e em proteína FtsZ bacteriana, comumente presente na microbiota intestinal, sugere que pode haver um mimetismo molecular levando à reação cruzada e à perda da autotolerância⁶⁸.

Ambientalmente, embora os mecanismos exatos permaneçam incertos, as exposições a toxinas e infecções virais e bacterianas têm sido apontadas como possíveis etiologias⁶⁹. Aparentemente, a composição da microbiota intestinal encontra-se alterada em pacientes com CEP, havendo redução na variedade de bactérias⁷⁰. Alguns estudos genéticos também apontaram para um possível papel da microbiota intestinal no início dos eventos patogénicos da CEP, sobretudo em interações realizadas com a proteína fucosil-

transferase estabilizadora de glicocálice 2 (FUT2) de colangiócitos^{71,72}. Nesse contexto, os antígenos bacterianos oriundos da circulação portal, expõem o epitélio biliar aos padrões moleculares relacionados a patógenos (pathogen-associated molecular pattern ou PAMPs), ativando o sistema imune inato. Através da ativação de *toll-like receptors* (TLRs) dos colangiócitos, especialmente TLR-4 por lipopolissacarídeos bacterianos, ocorre secreção de citocinas pró-inflamatórias com recrutamento de macrófagos, células dendríticas e células NK⁷³.

2.3.3 Apresentação clínica e diagnóstico

A CEP possui curso clínico variável. Inicialmente, pode se apresentar de forma assintomática, sendo detectada por alterações radiológicas ou laboratoriais em até 50% dos casos⁷⁴. Na forma sintomática, os sintomas mais comuns são dor abdominal, fadiga, icterícia e prurido, podendo ocorrer, com a progressão da doença, episódios de colangite⁵⁵. Na maioria dos pacientes, a doença é progressiva, culminando em cirrose biliar, insuficiência hepática e morte^{75,4}. Ademais, há um aumento no risco de neoplasias malignas, sobretudo colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar e carcinoma colônico³.

Os marcadores séricos de colestase fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase encontram-se comumente elevados, embora não em todos os casos. Sobretudo nas fases iniciais, as bilirrubinas mantêm-se dentro dos limites da normalidade. O aumento de aminotransferases é comum, mas geralmente de forma discreta. Em até 15% dos pacientes, pode haver aumento sérico de IgG4, o que pode dificultar o diagnóstico diferencial com colangiopatia associada a IgG4. Autoanticorpos têm prevalência aumentada, sendo encontrados em até 97% dos pacientes de acordo com alguns estudos, mas nenhum deles tem especificidade para CEP^{54 52,23}.

O diagnóstico frequentemente envolve colangiografia, seja por ressonância magnética ou endoscopia retrógrada, em que se evidenciam múltiplas constrições da via biliar intra e/ou extra-hepática⁷⁶. A biópsia hepática também pode contribuir no diagnóstico, sobretudo mediante suspeita de síndrome de sobreposição, CEP de pequenos ductos e colangiopatia relacionada a IgG4^{6 51 77}.

2.3.4 Histologia

A CEP é caracterizada por ser uma doença fibro-obliterativa dos ductos biliares intra-hepáticos e extra-hepáticos, levando a estenoses múltiplas e dilatações focais. Nos estádios iniciais, há graus variados de infiltrado inflamatório periportal e de sinais de agressão ao epitélio ductal biliar. Conforme a doença progride, há deposição de fibras colágenas periductal, levando ao estreitamento de ductos biliares e à fibroplasia lamelar concêntrica (“fibrose em casca de cebola”). Consequentemente, pode ocorrer atrofia dos ductos biliares, ductopenia e, em fases avançadas, cirrose biliar³⁷.

Hepatite de interface e alterações necroinflamatórias do parênquima hepatocitário também são observadas, embora sejam menos proeminentes do que na CBP^{78 67}. Ao contrário desta, a CEP tende a apresentar lesões inflamatórias menos floridas e raramente apresenta granulomas epitelioides e plasmócitos^{78 77}.

2.3.5 Tratamento

O tratamento da CEP ainda representa um desafio clínico, e o transplante hepático continua sendo a única opção curativa para estádios avançados da doença. No entanto, a recidiva da doença pós-transplante ocorre em até 20% dos casos⁷⁹. Até o momento, não há tratamento medicamentoso que comprovadamente retarde a evolução para cirrose⁵². O AUDC em altas doses tem sido utilizado como uma opção de tratamento, mas os resultados são controversos. Embora possa melhorar os marcadores bioquímicos, não há evidências conclusivas de que ele retarde a progressão da doença ou melhore a sobrevivência a longo prazo⁸⁰.

Os antibióticos, a exemplo da vancomicina, têm sido estudados com melhora significativa dos marcadores bioquímicos hepáticos, o que corrobora as evidências etiopatogênicas que envolvem inflamação, microbiota intestinal e homeostase biliar⁸¹. O bezafibrato, um agonista do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR), mostrou-se promissor em estudos prospectivos. Ele foi eficaz na melhoria dos marcadores bioquímicos de colestase e pode ser uma opção viável para pacientes que não respondem bem ao AUDC⁸². Vários outros ensaios clínicos estão ocorrendo, incluindo drogas antifibróticas e transplante de microbiota fecal⁸¹.

2.3.6 Fatores prognósticos

A avaliação prognóstica na CEP, embora mais comumente utilizada em ensaios clínicos, tem se baseado em diversos escores propostos, incluindo o escore de Child-Pugh e o escore Mayo. Entretanto, são fatores de melhor prognóstico entre as casuísticas descritas: idade mais jovem ao diagnóstico, sexo feminino, fosfatase alcalina normal ou reduzida (a despeito de tratamento com AUDC), doença de pequenos ductos biliares e síndrome de sobreposição com hepatite autoimune. Por outro lado, os fatores de mau prognóstico são constrições extensas/dominantes de vias biliares, níveis séricos elevados de bilirrubinas totais basais, colangite recorrente, retocolite ulcerativa e/ou colangiocarcinoma associados, sinais de imagem e/ou histologia de doença avançada, doença hepática descompensada e cirrose com hipertensão porta^{3 83 84}. Além disso, segundo o Grupo de Estudo de CEP, a avaliação histológica, além de realizar estadiamento e graduação da doença, também pode representar um desfecho substituto (*surrogate endpoint*) em ensaios clínicos, sobretudo se associada à dosagem sérica de fosfatase alcalina. Há evidências de que os níveis séricos de bilirrubinas totais ao diagnóstico associam-se com necessidade de transplante,

desenvolvimento de colangiocarcinoma e morte⁸⁵. No Brasil, observou-se pior prognóstico da doença, provavelmente associado ao estágio já avançado dos pacientes ao diagnóstico⁵⁷.

2.4 Critério de Toronto

O Critério de Toronto é uma métrica estabelecida para avaliar a resposta ao tratamento com AUDC em pacientes com CBP. Especificamente, os pacientes são considerados respondedores quando apresentam níveis de fosfatase alcalina (FA) $\leq 1,67$ vezes o limite superior do normal dois anos após o início do tratamento. Esta métrica serve como um indicador padronizado no manejo clínico de CBP, permitindo uma avaliação objetiva da eficácia do tratamento⁸⁶.

O estudo utilizou biópsias pareadas dos mesmos pacientes em 10 anos de progressão da doença, sendo, dessa forma, um critério prognóstico capaz de prever a progressão histológica a longo prazo da CBP. Pacientes que atendem a este critério têm menor probabilidade de apresentar progressão histológica da doença, o que é um fator crítico para estratificação de risco e manejo clínico eficaz^{48 87}. Contudo, não há estudos validados sobre a aplicabilidade do Critério de Toronto na CEP ou sua relação com a progressão histológica da doença⁸⁸.

2.5 Classificação histológica de Nakanuma

2.5.1 Antecedentes científicos

O prognóstico da CBP e da CEP se correlacionam com o estadiamento histológico, havendo associação com sobrevida e necessidade de transplante hepático^{9 89}. Tradicionalmente, os patologistas utilizam os sistemas de classificação de Ludwig et al.⁷ e de Scheuer e Lefkowitz⁸, que dividem essas doenças em quatro estádios sucessivos. Inicialmente, esses sistemas foram propostos para estadiamento da CBP, sendo sua ampliação para os casos de CEP corroborada por diversos estudos nos anos 1980 e 90^{74,75 75}.

O sistema de Ludwig baseia-se nas seguintes características histopatológicas: o estágio 1 compreende infiltrado inflamatório restrito ao espaço portal; o estágio 2 caracteriza-se por extensão das lesões periportais ao parênquima hepático (hepatite de interface); no estágio 3, observa-se necrose e/ou fibrose em ponte; e, no estágio 4, tem-se cirrose⁷. Já no sistema de Scheuer, o estágio 1 é caracterizado por lesão ductal florida; o estágio 2, por proliferação de ductos biliares; o estágio 3, por fibrose e cicatrizes; e o estágio 4, por cirrose⁸.

Embora sejam os sistemas mais utilizados na prática clínica, têm como limitação a sobreposição de estádios e a incorporação da atividade da doença (gradação) nos estádios, como a hepatite de interface, perda de ductos biliares e acúmulo de proteína associada ao cobre, que pioram à medida que a CBP e a CEP progridem. Ademais, a

concordância interobservador, a distribuição heterogênea das doenças hepáticas crônicas pelo órgão e fatores pré-analíticos, como a qualidade e a quantidade da amostra, também são dificuldades na aplicabilidade desses sistemas^{9 90}.

2.5.2 Classificação histológica de Nakanuma e validação

Na tentativa de superar as limitações dos sistemas clássicos, sobretudo quanto às características histológicas de atividade da doença, Nakanuma et al.¹¹ propuseram um novo sistema de estadiamento e graduação da CBP em 2006. O estadiamento é feito com base em três características: fibrose, perda de ducto biliar e colestase crônica, que é avaliada por meio de grânulos orceína-positivos (Tabela 1 do artigo). Se a coloração de orceína não está disponível, a avaliação é feita com base na fibrose e perda de ductos biliares, o que é aplicável. Após avaliação dessas características, a somatória das variáveis é o determinante do estágio (Tabela 2 do artigo)^{11,12}.

A graduação da atividade necroinflamatória (Tabela 3 do artigo) é feita com base nas atividades da colangite crônica e hepatítica, cada uma disposta em quatro graus (0 a 4). A atividade da colangite crônica compreende desde o discreto infiltrado inflamatório periductal inicial até a colangite destrutiva crônica não-supurativa. Entretanto, cabe ressaltar que a colangite associada a um infiltrado linfoplasmacítico pode ser eventualmente encontrado em hepatites virais e os ductos biliares interlobulares adjacentes a um infiltrado inflamatório portal ou com pequeno número de linfócitos/plasmócitos não devem ser avaliados como colangite crônica. Já a atividade hepatítica se refere à hepatite de interface, que, com a progressão da doença, passa a ser vista em mais tratos portais e com extensão ao parênquima hepatocitário, eventualmente acompanhada de necrose zonal ou em ponte¹¹.

Em 2010, Nakanuma et al.¹² revisaram a classificação, mantendo-se os critérios de estadiamento, e validaram o sistema com base na análise de 62 biópsias hepáticas por agulha de CBP por 28 patologistas, visando à sua maior aplicabilidade na prática da Patologia Cirúrgica (Tabela 4). Para o estadiamento, a taxa de concordância foi de 63,9% e o kappa foi de 0.385 (concordância razoável). Contudo, as taxas de concordância e o kappa para atividade da colangite crônica e hepatítica foram, respectivamente, 36.9% e 0.110 (pouca concordância) e 47% e 0.197 (pouca concordância). Assim, os autores propuseram maior cuidado na graduação da atividade necroinflamatória, sendo necessários mais estudos e eventuais revisões dos critérios¹².

Em 2013, um novo estudo comparou o uso do escore de Nakanuma com os sistemas antigos a partir de 152 biópsias de casos de CBP, encontrando diferentes distribuições em cada estágio de acordo com o sistema utilizado. Todos os sistemas apresentaram correlação com parâmetros prognósticos significantes, sobretudo a bilirrubina sérica e os escores Mayo e Model for End-stage Liver Disease (MELD). Contudo, o escore de Child-Pugh e o desenvolvimento de sintomas relacionados ao fígado teve melhor correlação com

o escore de Nakanuma em relação aos sistemas de Ludwig e Scheuer, sugerindo, portanto, que seu emprego reflete bem as características clínico-laboratoriais da doença⁹⁰.

2.5.3 Sistemas de estadiamento histológico e colangite biliar primária (CEP)

Os sistemas de estadiamento clássicos e o escore de Nakanuma foram inicialmente validados para a CBP, não havendo estudos quanto à sua aplicabilidade na CEP até 2015, quando Elisabeth M. G. De Vries et al.⁹ avaliaram o uso dos escores de Ludwig, Ishak e Nakanuma em uma coorte de 64 pacientes holandeses, correlacionando-os com três desfechos: sobrevida livre de transplante hepático, tempo para o transplante hepático e ocorrência de sintomas relacionados à cirrose. Detectou-se forte associação entre os estádios da doença estabelecidos com base nos três escores e os dois primeiros desfechos. Contudo, os escores de Ishak e Nakanuma não se associaram com a ocorrência de sintomas relacionados à cirrose e a associação entre histopatologia e alterações laboratoriais foi fraca⁹. Em 2016, um estudo de coorte internacional¹³ demonstrou que os sistemas de Ludwig e Nakanuma são aplicáveis à CEP, tendo a classificação de Nakanuma maior associação com transplante e mortalidade relacionada à doença, além de sugerir possível uso como *surrogate endpoints* em ensaios clínicos. Mais recentemente, Sjöblom et. al propuseram um novo escore histológico com aplicabilidade apenas na CEP, comparando-o com o escore de Nakanuma, ambos obtendo correlação com a progressão da doença⁹¹.

3 JUSTIFICATIVA

Embora validado para CBP, há poucos estudos explorando a aplicabilidade do sistema de classificação de Nakanuma, correlacionando-o com parâmetros clínicos e laboratoriais, sobretudo na CEP. Dado o perfil epidemiológico raro e a notável variabilidade geográfica na apresentação e evolução dessas doenças, não há estudos que correlacionem a aplicação desse sistema histológico em biópsias hepáticas de pacientes brasileiros, uma vez que a sua validação ocorreu em populações asiáticas e europeias. Adicionalmente, destaca-se a ausência de estudos que analisem a aplicabilidade do Critério de Toronto na CEP e sua correlação com o estadiamento histológico de Nakanuma. Esta lacuna de pesquisa ressalta a necessidade de investigações mais abrangentes que considerem as particularidades da população brasileira, contribuindo assim para uma compreensão mais abrangente e um melhor manejo e acompanhamento dos portadores dessas colangiopatias.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

- Avaliar o escore de Nakanuma em biópsias hepáticas de casos de CBP e CEP acompanhados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e outros serviços de Hepatologia de Belo Horizonte – Minas Gerais.
- Correlacionar os parâmetros do escore de Nakanuma com parâmetros clínicos (idade, sexo e forma clínica) e laboratoriais (AST, ALT, FA e bilirrubinas totais), dois anos após início do acompanhamento.

4.2 Objetivos específicos

- Correlacionar os parâmetros da classificação de Nakanuma com parâmetros clínicos (idade, sexo e forma clínica) e laboratoriais (AST, ALT, FA, GGT e bilirrubinas totais séricas), dois anos após início do acompanhamento, em pacientes com CBP e CEP.
- Correlacionar a taxa de resposta pelo critério de Toronto com a classificação de Nakanuma em pacientes com CBP e CEP.

5 MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seções materiais e métodos, resultados e discussão serão apresentados nesta sessão sob a forma de um artigo científico, que será submetido à revista *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* e está formatado segundo as normas desta revista.

REFERÊNCIAS

- [1] Lv T, Chen S, Li M, Zhang D, Kong Y, Jia J. Regional variation and temporal trend of primary biliary cholangitis epidemiology: A systematic review and meta-analysis. 2021 6;36(6):1423 – 1434.
- [2] Pullen R. A Clinical Review of Primary Biliary Cholangitis. 2020;43(2):E48 – E55.
- [3] Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. Lancet (London, England). 2018 2;391:2547 – 2559.
- [4] Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. vol. 382; 2013. p. 1587 – 1599.
- [5] Jabłońska J, Cielecka-Kuszyk J, Mikula T, Kozłowska J, Wiercińska-Drapało A. Hepatopathy of unknown etiology - Is liver biopsy a good tool in differential diagnosis? 2019;15(6):1462 – 1467.
- [6] COUTO CA, TERRABUIO DRB, CANÇADO ELR, PORTA G, LEVY C, SILVA AEB, et al. UPDATE OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY RECOMMENDATIONS FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES OF THE LIVER. 2019 6;56(2):232 – 241.
- [7] Ludwig J, Dickson ER, McDonald GSA. Staging of Chronic Nonsuppurative Destructive Cholangitis (Syndrome of Primary Biliary Cirrhosis); 1978.
- [8] Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver biopsy interpretation. London; 2006.
- [9] Vries EMGD, Verheij J, Hubscher SG, Leeflang MMG, Boonstra K, Beuers U, et al. Applicability and prognostic value of histologic scoring systems in primary sclerosing cholangitis;.
- [10] Chan AWH, Chan RCK, Wong GLH, Wong VWS, Choi PCL, Chan HLY, et al. Evaluation of histological staging systems for primary biliary cirrhosis: Correlation with clinical and biochemical factors and significance of pathological parameters in prognostication. 2014;65(2):174 – 186.
- [11] Hiramatsu K, Aoyama H, Zen Y, Aishima S, Kitagawa S, Nakanuma Y. Proposal of a new staging and grading system of the liver for primary biliary cirrhosis. 2006 11;49(5):466 – 478.
- [12] Nakanuma Y, Zen Y, Harada K, Sasaki M, Nonomura A, Uehara T, et al. Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement. 2010 3;60(3):167 – 174.
- [13] Vries EMGD, Krijger MD, Arkkilä MF, Arola J, Schirmacher P, Gotthardt D, et al. Validation of the Prognostic Value of Histologic Scoring Systems in Primary Sclerosing Cholangitis: An International Cohort Study. 2016;Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28963>.
- [14] Sherlock S. ASPIRATION LIVER BIOPSY. 1945 9;246(6370):397 – 401.
- [15] Leeuwen DV, Wilson L, Crowe D. Liver Biopsy in the Mid-1990s: Questions and Answers. 1995 3;15(04):340 – 359.

- [16] Sheela H, Seela S, Caldwell C, Boyer JL, Jain D. Liver Biopsy. 2005 8;39(7):603 – 610.
- [17] Knawy BA, Shiffman M. Percutaneous liver biopsy in clinical practice; 2007.
- [18] Neuberger J, Patel J, Caldwell H, Davies S, Hebditch V, Hollywood C, et al. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice from the British Society of Gastroenterology, the Royal College of Radiologists and the Royal College of Pathology. 2020 8;69(8):1382 – 1403.
- [19] Triger DR, Berg PA, Rodes J. Epidemiology of primary biliary cirrhosis; 1984.
- [20] Lv T, Chen S, Li M, Zhang D, Kong Y, Jia J. Regional variation and temporal trend of primary biliary cholangitis epidemiology: A systematic review and meta-analysis. 2021 6;36(6):1423 – 1434.
- [21] Prince MI, James OFW. The epidemiology of primary biliary cirrhosis; 2003.
- [22] Cançado GGL, Braga MH, Ferraz MLG, Villela-Nogueira CA, Terrabuio DRB, Cançado ELR, et al. Clinical features and treatment outcomes of primary biliary cholangitis in a highly admixed population. 2022 1;27(1).
- [23] Lleo A, Leung PSC, Hirschfield GM, Gershwin EM. The Pathogenesis of Primary Biliary Cholangitis: A Comprehensive Review; 2020.
- [24] Rong G, Zhong R, Lleo A, Leung PSC, Bowlus CL, Yang G, et al. Epithelial cell specificity and apoptotic recognition by serum autoantibodies in primary biliary cirrhosis. 2011 7;54(1):196 – 203.
- [25] Dubel L, Tanaka A, Leung PS, de Water JV, Coppel R, Roche T, et al. Autoepitope mapping and reactivity of autoantibodies to the dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein (E3BP) and the glycine cleavage proteins in primary biliary cirrhosis. 1999 4;29(4):1013 – 1018.
- [26] Takahashi T, Miura T, Nakamura J, Yamada S, Miura T, Yanagi M, et al. Plasma cells and the chronic nonsuppurative destructive cholangitis of primary biliary cirrhosis. 2012 3;55(3):846 – 855.
- [27] Nakanuma Y, Harada K, Kaji K, Terasaki S, Tsuneyama K, Moteki S, et al. Clinicopathological study of primary biliary antimitochondrial U - antibodies; 1997.
- [28] Selmi C, Invernizzi P, Zuan M, Podda M, Gershwin ME. Genetics and Geoepidemiology of Primary Biliary Cirrhosis: Following the Footprints to Disease Etiology. 2005 8;25(03):265 – 280.
- [29] Mitchison HC, Lucey MR, Kelly PJ, Neuberger JM, Williams R, James OFW. Symptom development and prognosis in primary biliary cirrhosis: A study in two centers. 1990;99(3):778 – 784.
- [30] Gulamhusein AF, Hirschfield GM. Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities; 2020.

- [31] Matsumoto K, Ohfuji S, Abe M, Komori A, Takahashi A, Fujii H, et al. Environmental factors, medical and family history, and comorbidities associated with primary biliary cholangitis in Japan: a multicenter case-control study. 2022 1;57(1):19 – 29.
- [32] Yang Y, Choi J, Chen Y, Invernizzi P, Yang G, Zhang W, et al. E. coli and the etiology of human PBC: Antimitochondrial antibodies and spreading determinants. 2022 2;75(2):266 – 279.
- [33] Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OFW. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: Clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort; 2004.
- [34] Lisboa P, Claudia B, Couto A. MANUAL DE CONDUTAS EM DOENÇAS COLESTÁTICAS E AUTOIMUNES DO FÍGADO; 2019.
- [35] Rabinovitz M, Appasamy R, Finkelstein S. Primary biliary cirrhosis diagnosed during pregnancy. 1995 3;40(3):571 – 574.
- [36] Levy C, Lindor KD. Management of osteoporosis, fat-soluble vitamin deficiencies, and hyperlipidemia in primary biliary cirrhosis. 2003 11;7(4):901 – 910.
- [37] Scheuer PJ. Pathologic features and evolution of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. vol. 73; 1998. p. 179 – 183.
- [38] Drebber U, Mueller JJM, Klein E, Kasper HU, Schulze F, Schardt K, et al. Liver biopsy in primary biliary cirrhosis: Clinicopathological data and stage: Original Article. 2009 8;59(8):546 – 554.
- [39] Nakanuma Y. Necroinflammatory Changes in Hepatic lobules in Primary Biliary Cirrhosis With less Well-Defined Cholestatic Changes; 1993.
- [40] Nakanuma Y, Karino T, Ohta G. Virchows Archiv A Orcein Positive Granules in the Hepatocytes in Chronic Intrahepatic Cholestasis Morphological, Histochemical and Electron X-Ray Microanalytical Examination; 1979.
- [41] Corpechot C, Carrat F, Bahr A, Chrétien Y, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. 2005;128(2):297 – 303.
- [42] Cançado GGL, Couto CA, Terrabuio DRB, Cançado ELR, Villela-Nogueira CA, Ferraz MLG, et al. Response to Ursodeoxycholic Acid May Be Assessed Earlier to Allow Second-Line Therapy in Patients with Unresponsive Primary Biliary Cholangitis. 2023 2;68(2):514 – 520.
- [43] Gossard AA, Lindor KD. Current and promising therapy for primary biliary cholangitis; 2019.
- [44] Markus BH, Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Mazzaferro V, Klintmalm GBG, et al. Efficacy of liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis. The New England Journal of Medicine;p. 1709 – 1713.

- [45] Jacob DA, Bahra M, Schmidt SC, Schumacher G, Weimann A, Neuhaus P, et al. Mayo risk score for primary biliary cirrhosis: A useful tool for the prediction of course after liver transplantation?;. Available from: <http://www.annalsoftransplantation.com/fulltxt.php?ICID=868537>.
- [46] Degott C, Zafrani ES, Callard P, Balkau B, Poupon RE, Poupon R. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. 1999;29(4):1007 – 1012.
- [47] Perez CFM, Hirschfield GM, Corpechot C, Floreani A, Mayo MJ, van der Meer A, et al. Fibrosis stage is an independent predictor of outcome in primary biliary cholangitis despite biochemical treatment response. 2019 11;50(10):1127 – 1136.
- [48] Kumagi T, Guindi M, Fischer SE, Arenovich T, Abdalian R, Coltescu C, et al. Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis. 2010 10;105(10):2186 – 2194.
- [49] Goet JC, Perez CFM, Harms MH, Floreani A, Cazzagon N, Bruns T, et al. A Comparison of Prognostic Scores (Mayo, UK-PBC, and GLOBE) in Primary Biliary Cholangitis. 2021 7;116(7):1514 – 1522.
- [50] Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: Model for decision making. 1989 7;10(1):1 – 7.
- [51] Singal AK, Stanca CM, Clark V, Dixon L, Levy C, Odin JA, et al. Natural history of small duct primary sclerosing cholangitis: A case series with review of the literature. 2011 9;5(3):808 – 813.
- [52] Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis-a comprehensive review;.
- [53] AADLAND JJKMBE. Incidence and Prevalence of Primary Biliary Cirrhosis, Primary Sclerosing Cholangitis, and Autoimmune Hepatitis in a Norwegian Population. 1998 1;33(1):99 – 103.
- [54] Feldstein AE, Perrault J, El-Youssif M, Lindor KD, Freese DK, Angulo P. Primary sclerosing cholangitis in children: A long-term follow-up study. 2003 7;38(1):210 – 217.
- [55] Fricker ZP, Lichtenstein DR. Primary Sclerosing Cholangitis: A Concise Review of Diagnosis and Management; 2019.
- [56] Lunder AK, Hov JR, Borthne A, Gleditsch J, Johannesen G, Tveit K, et al. Prevalence of Sclerosing Cholangitis Detected by Magnetic Resonance Cholangiography in Patients With Long-term Inflammatory Bowel Disease. 2016 10;151(4):660 – 669.e4.
- [57] Nardelli MJ, Bittencourt PL, Cançado GGL, Faria LC, Villela-Nogueira CA, Rotman V, et al. Clinical Features and Outcomes of Primary Sclerosing Cholangitis in the Highly Admixed Brazilian Population. 2021 11;2021:1 – 8.
- [58] Bergquist A, Lindberg G, Saarinen S, Broomé U. Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives. 2005 2;42(2):252 – 256.

- [59] BERGQUIST A, MONTGOMERY S, BAHMANYAR S, OLSSON R, DANIELSSON A, LINDGREN S, et al. Increased Risk of Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis in First-Degree Relatives of Patients With Primary Sclerosing Cholangitis. 2008 8;6(8):939 – 943.
- [60] Donaldson PT, Farrant JM, Wilkinson ML, Hayllar K, Portmann BC, Williams R. Dual association of HLA DR2 and DR3 with primary sclerosing cholangitis. 1991;13(1):129 – 133.
- [61] Folseraas T, Melum E, Rausch P, Juran BD, Ellinghaus E, Shiryaev A, et al. Extended analysis of a genome-wide association study in primary sclerosing cholangitis detects multiple novel risk loci. 2012 8;57(2):366 – 375.
- [62] Ponsioen CY, Kuiper H, Kate FJT, van Milligen de Wit M, van Deventer SJ, Tytgat GN. Immunohistochemical analysis of inflammation in primary sclerosing cholangitis. 1999 7;11(7):769 – 774.
- [63] Kamihira T, Shimoda S, Nakamura M, Yokoyama T, Takii Y, Kawano A, et al. Biliary epithelial cells regulate autoreactive T cells: Implications for biliary-specific diseases. 2005 1;41(1):151 – 159.
- [64] Eksteen B, Grant AJ, Miles A, Curbishley SM, Lalor PF, Hubscher SG, et al. Hepatic Endothelial CCL25 Mediates the Recruitment of CCR9+ Gut-homing Lymphocytes to the Liver in Primary Sclerosing Cholangitis. 2004 12;200(11):1511 – 1517.
- [65] Liaskou E, Karikoski M, Reynolds GM, Lalor PF, Weston CJ, Pullen N, et al. Regulation of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 expression in human and mice by vascular adhesion protein 1 amine oxidase activity. 2011 2;53(2):661 – 672.
- [66] Cameron RG, Blendis LM, Neuman MG. Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis. 2001 5;34(3):195 – 201.
- [67] Worthington J, Cullen S, Chapman R. Immunopathogenesis Index Entries Immunopathogenesis of Primary Sclerosing Cholangitis; 2005.
- [68] Terjung B, Spengler U. Atypical p-ANCA in PSC and AIH: A Hint Toward a “leaky gut”? 2009 2;36(1):40 – 51.
- [69] Menon KVN, Wiesner RH. Etiology and natural history of primary sclerosing cholangitis. 1999;6(4):343 – 351.
- [70] Özdirik B, Müller T, Wree A, Tacke F, Sigal M. The Role of Microbiota in Primary Sclerosing Cholangitis and Related Biliary Malignancies. 2021 6;22(13):6975 –.
- [71] Tabibian JH, Talwalkar JA, Lindor KD. Role of the Microbiota and Antibiotics in Primary Sclerosing Cholangitis. 2013;2013:1 – 7.
- [72] Maroni L, Hohenester SD, van de Graaf SFJ, Tolenaars D, van Lienden K, Verheij J, et al. Knockout of the primary sclerosing cholangitis-risk gene *Fut2* causes liver disease in mice. 2017 8;66(2):542 – 554.
- [73] Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: Update. 2008 7;48(1):322 – 335.

- [74] Broome U, Olsson R, Loof L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson A, et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. 1996 4;38(4):610 – 615.
- [75] Wiesner RH, Grambsch PM, Dickson ER, Ludwig J, Maccarty RL, Hunter EB, et al. Primary sclerosing cholangitis: Natural history, prognostic factors and survival analysis. 1989 10;10(4):430 – 436.
- [76] Khoshpouri P, Habibabadi RR, Hazhirkarzar B, Ameli S, Ghadimi M, Ghasabeh MA, et al. Imaging Features of Primary Sclerosing Cholangitis: From Diagnosis to Liver Transplant Follow-up. 2019 11;39(7):1938 – 1964.
- [77] Nalbantoglu I, Misdraji J. Approach to the liver biopsy diagnosis of adult cholangiopathies;.
- [78] Wiesner RH, Larusso NF, Ludwig J, Dickson ER. Comparison of the Clinicopathologic Features of Primary Sclerosing Cholangitis and Primary Biliary Cirrhosis. 1985;88(1):108 – 114.
- [79] Narumi S, Roberts JP, Emond JC, Lake J, Ascher NL. Liver transplantation for sclerosing cholangitis. 1995 8;22(2):451 – 457.
- [80] Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VAC, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. 2009;50(3):808 – 814.
- [81] Karlsen TH, Boberg KM. Update on primary sclerosing cholangitis; 2013.
- [82] Mizuno S, Hirano K, Isayama H, Watanabe T, Yamamoto N, Nakai Y, et al. Prospective study of bezafibrate for the treatment of primary sclerosing cholangitis. 2015 10;22(10):766 – 770.
- [83] Weismüller TJ, Trivedi PJ, Bergquist A, Imam M, Lenzen H, Ponsioen CY, et al. Patient Age, Sex, and Inflammatory Bowel Disease Phenotype Associate With Course of Primary Sclerosing Cholangitis. 2017 6;152(8):1975 – 1984.e8.
- [84] Tischendorf JJW, Hecker H, Krüger M, Manns MP, Meier PN. Characterization, outcome, and prognosis in 273 patients with primary sclerosing cholangitis: A single center study. 2007 1;102(1):107 – 114.
- [85] Ponsioen CY, Chapman RW, Chazouillères O, Hirschfield GM, Karlsen TH, Lohse AW, et al. Surrogate endpoints for clinical trials in primary sclerosing cholangitis: Review and results from an International PSC Study Group consensus process. 2016 4;63(4):1357 – 1367.
- [86] Buddha M, Sanchez MM, Avila DJ, Romero JE, Romero A, Egwim C, et al. Assessment of Toronto Criteria for Response to Ursodiol Use Among PBC Patients in a Community Outpatient Setting; 2021. Available from: <http://journals.lww.com/ajg>.
- [87] Kowdley KV. An Examination of the Evidence Behind Biochemical Markers in Primary Biliary Cholangitis; 2021.
- [88] Haseeb A, Cox K, Adler D. Initial Serum Bilirubin Level as a Predictor of Clinical End Points in Primary Sclerosing Cholangitis. 2014 10;109:S166 –.

-
- [89] Locke GR, Therneau TM, Ludwig J, Dickson ER, Lindor KD. Time course of histological progression in primary biliary cirrhosis. 1996 1;23(1):52 – 56.
- [90] Chan AWH, Chan RCK, Wong GLH, Wong VWS, Choi PCL, Chan HLY, et al. Evaluation of histological staging systems for primary biliary cirrhosis: correlation with clinical and biochemical factors and significance of pathological parameters in prognostication. 2014 8;65(2):174 – 186.
- [91] Sjöblom N, Boyd S, Kautiainen H, Arola J, Färkkilä M. Novel histological scoring for predicting disease outcome in primary sclerosing cholangitis. 2022 8;81(2):192 – 204.

Nakanuma's Histological Classification System in a Brazilian Cohort: Clinical and Biochemical Associations in Primary Biliary and Sclerosing Cholangitis

Jésus Faria Rosa Júnior¹

Claudia Alves Couto²

Paula Vieira Teixeira Vidigal³

2024

ABSTRACT

Background: Primary Biliary Cholangitis (PBC) and Primary Sclerosing Cholangitis (PSC) are chronic liver diseases with distinct epidemiological profiles. This study aims to evaluate the application of the Nakanuma scoring system in a Brazilian cohort, exploring its correlation with clinical and laboratory parameters in PBC and PSC.

Methods: This retrospective study included 32 PBC cases and 36 PSC cases from the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais and other hepatology services in Belo Horizonte, Brazil. Histopathological changes were assessed using the Nakanuma's Classification System. Clinical and laboratory data, including serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP), were analyzed. Correlations between histological scores and clinical parameters were examined.

Results: The PBC group consisted of 30 women and 2 men, with an average age of 58.2 years. The PSC group comprised 24 men and 12 women, with an average age of 35.7 years. In PSC patients, cholangitic activity was significantly associated with AST and ALT serum levels. In PBC patients, a significant correlation was observed between higher histological stages and increased ALP serum levels. Nakanuma Stage 3 and 4 correlated with $ALP > 1,67 \times$ upper limit of normality, indicating a weaker clinical response to ursodeoxycholic acid treatment, which aligns with long-term prognosis as per the Toronto Criteria. However, these criteria did not hold significance for PSC in our study.

Conclusion: Our study reveals a noteworthy association between Nakanuma's grading of Cholangitis Activity and serum ALT and AST levels in PSC. Additionally, we observed a correlation between serum ALP and histological stage, both of which negatively scale with treatment response and, hence, long-term prognosis. These findings underscore the utility of the Nakanuma classification system in providing valuable insights into disease progression and prognosis in the Brazilian population.

1 INTRODUCTION

Primary Biliary Cholangitis (PBC) is an autoimmune liver disease that predominantly impacts middle-aged to elderly individuals. Epidemiologically, the incidence and prevalence of this

¹ Anatomia Patológica e Medicina Legal – Universidade Federal de Minas Gerais – juniorfariarosa@gmail.com

² Clínica Médica – Universidade Federal de Minas Gerais

³ Anatomia Patológica e Medicina Legal – Universidade Federal de Minas Gerais

condition exhibit substantial global variability, showcasing a discernible upward trend¹. It predominantly manifests in women and frequently coexists with other autoimmune disorders, notably autoimmune hepatitis (AIH). Clinically, the diagnosis of PBC commonly relies on the detection of anti-mitochondrial antibodies (AMA) or other specific antibodies (including sp100 or gp210) in a patient with persistent elevation of alkaline phosphatase (ALP)^{2,3}. The mainstay of treatment includes ursodeoxycholic acid (UDCA), which has shown effectiveness in delaying disease progression. The Toronto Criteria serves as a predictor of long-term outcomes and a form of access to therapeutic response to UDCA, defined as an inadequate response ALP >1.67 times the upper limit of normality (ULN) two years after starting the treatment, which correlates with long-term prognosis^{4,5}. However, prognosis varies and can be influenced by several factors, including age, ALP, total bilirubin levels, biochemical response to UDCA and histological stage^{6,7,8,9,10,11}.

Primary Sclerosing Cholangitis (PSC) is another chronic liver disease, characterized by inflammation and fibrosis of the bile ducts. This condition leads to cholestasis, liver cirrhosis, and elevates the risk of developing neoplasias, including cholangiocarcinoma. The precise etiology of PSC remains elusive, with indications pointing toward a multifactorial origin encompassing genetic, immune, microbiologic, and environmental factors. Unlike PBC, PSC affects both men and women relatively equally, exhibiting geographic variations, and is often associated with inflammatory bowel diseases, particularly ulcerative colitis^{12,13}. The diagnosis typically involves imaging studies, such as magnetic resonance cholangiopancreatography, along with liver function tests³. Treatment options are limited, often involving high doses of UDCA and liver transplantation^{14,15}. Prognostically, a more favorable outcome is related to younger age at diagnosis, normal ALP, small duct PSC and overlap with AIH¹⁶.

Even though liver biopsy is not necessary to diagnose PBC and PSC, it is useful to identify overlap syndrome, AMA-negative PBC and small duct PSC³. Liver biopsy can also aid in staging the disease, guiding treatment and evaluating prognosis¹⁷. The Ludwig staging system has been a traditional method for histological assessment in PBC, focusing on the progression from bile duct destruction to portal inflammation and eventually to cirrhosis¹⁸. On the other hand, while the Scheuer system also stages PBC based on similar parameters, it includes additional features like fibrosis and inflammation¹⁹. Despite its broader scope, the Scheuer system shares similar limitations, including subjectivity, interobserver agreement, stage superposition and incorporation of the disease's inflammatory activity as part of the stage^{20,21}.

The Nakanuma's histological classification system aims to address these limitations by offering a more comprehensive framework for evaluating PBC. It considers duct loss, fibrosis and chronic cholestasis as stage factors, along with immune-mediated cholangitis and hepatitis activity as necroinflammatory grading (Tables 1, 2 and 3)²². The system has been validated by subsequent research and system review, offering a more nuanced and reliable approach

to disease assessment²³. Anthony W. H. Chan et al. (2014)²⁴ compared this system with traditional Scheuer and Ludwig systems and found out that, even though they all correlated with significant prognostic parameters, the Nakanuma Classification outperformed the formers. De Vries et al. (2015) evaluated its applicability on PSC, detecting a strong association between Nakanuma stage, transplant-free survival and time to liver transplantation²⁰. The feasibility of this histological score application on PSC was subsequently validated in an international european cohort study²⁵.

Acknowledging the influence of unique geographic and clinical aspects on the presentation of these diseases, our paper aims to elucidate the results obtained from applying Nakanuma's classification system to cases of PBC and PSC. This investigation establishes correlations between the classification system and clinical-laboratory parameters within a cohort of Brazilian patients. It is worth noting that our research represents the first implementation of Nakanuma's system in the Brazilian population, which is known for its significant genetic admixture and distinct epidemiological features.^{26,27}.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study Groups and Data Collection

This retrospective study encompassed 32 cases of PBC and 36 cases of PSC with hepatic biopsies conducted near diagnosis. Patients were followed up at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais and other Hepatology services in Belo Horizonte between 1992 and 2019. Included patients had confirmed diagnoses of PBC or PSC, including overlap syndrome with autoimmune hepatitis. Patients with alternative causes of hepatopathy, such as viral etiology, were excluded based on predefined criteria. Investigators collected data from medical records using a standardized database by the Brazilian Cholestasis Study Group, accessed retrospectively.

Analyses included sex, age, presence of overlap syndrome or small duct PSC, and laboratory data, with a 2-year follow-up. Laboratory parameters evaluated were serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin and gamma-glutamyltransferase (GGT). Dosages were assessed after 2 years from the start of the follow-up. In PBC cases, evaluation occurred 2 years post initiation of UDCA. For serum ALP, the validated parameter in the Toronto Criteria for PBC was used, which is serum ALP divided by upper limit of normal (ULN).

This study was approved by the Comitê de Ética of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE 64662222.4.0000.5149) and was conducted following the ethical standards of the Helsinki Declaration.

2.2 Histopathological Analysis

Histological sections from needle liver biopsy specimens, fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and Picro-Sirius or Masson Trichrome staining, were examined. To qualify for inclusion in the study, each specimen had to contain a minimum of six portal tracts. Two pathologists, J.F.R.J and P.V.T.V., the latter specialized in liver pathology, independently evaluated these sections. The staging and grading of each specimen were initially conducted according to the Nakanuma's classification system by each pathologist separately. Staging was determined solely through the assessment of fibrosis score and bile duct loss — without considering orcein-positive granule deposition. This was followed by a joint reassessment, where both pathologists collaborated using a multiheaded microscope. These analyses were carried out by the pathologists without access to clinical information, ensuring a blind evaluation (Figure 1).

2.3 Statistical Analysis

To describe the personal and clinical characteristics of the PSC (n = 36 cases) and PBC (n = 32 cases) groups, descriptive measures, Mean and Standard Deviation (s.d.), were presented for quantitative variables. Absolute (n) and relative (%) frequencies were used for categorical/ordinal variables. Due to the non-fulfillment of the assumptions of the Student's t-test for independent samples (parametric test), the non-parametric Mann-Whitney test was applied. This choice was necessitated by the division of the four levels of the three parameters of the Nakanuma Score into two distinct categories, driven by the low frequency of patients in certain grades of Staging, Cholangitis Activity and Hepatitis Activity, thus preventing direct comparison of the four levels. Subsequently, the significance probability (z) and effect size for non-parametric tests (r) were calculated. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

3 RESULTS

The descriptive clinical and laboratory data and hepatic biopsy analysis based on Nakanuma's classification system are detailed in Table 4. The patient sample with PBC consisted of 30 women (93.8%) and 2 men (6.3%), with a mean age of 58.2 years (range 30-81 years). Among them, eight had overlap syndrome (33.3%). The mean levels of AST, ALT, and ALP for this group were, respectively, 40.5 IU/l, 37.4 IU/l and 180.5 and IU/l. Examining the Nakanuma's classification in PBC liver biopsies, we found two patients in stage 1, eleven in stage 2, ten in stage 3, and nine in stage 4. Cholangitis Activity had four patients at grade 0, eight at grade 1, eleven at grade 2 and nine at grade 3. The distribution of Hepatitis Activity in groups 0, 1, 2, and 3 were fourteen, seven, six and five, respectively.

The patient group with PSC comprised 36 individuals, 24 men (66.7%) and 12 women (33.3%), with a mean age of 35.7 years (range 17-71 years). The cohort included 26 patients with the classic form (74.3%), 7 with overlap syndrome (19.4%), and 4 with small duct PSC (11.1%). The mean levels of AST, ALT, and ALP over 2 years were, respectively, 88.6 IU/l, 92.9 IU/l, and 344.7 IU/l. Regarding the Nakanuma's classification staging, there were three patients in stage 1, 10 in stage 2, seventeen in stage 3 and six in stage 4. The grading of Cholangitis Activity placed seven patients at grade 0, sixteen at grade 1, seven at grade 2 and six at grade 3. Hepatitis Activity was distributed as fourteen, nine, eleven and one patients in groups 0, 1, 2, and 3, respectively.

To correlate with laboratory data, patients were categorized into "1 or 2" and "3 or 4" groups for staging, and into "0 or 1" and "2 or 3" groups for grading parameters (Tables 5 and 6). A statistically significant difference was observed ($p = 0.046$; $Z = 1.982$ and $r = 0.36$, hence, $p < 0.05$) between PSC patients with Cholangitis Activity levels "0 or 1" and those with levels "2 or 3" in the distribution of ALT measures at 2 years (Table 5).

Strictly speaking, there is no statistically significant difference ($p = 0.053$, $Z = 1.927$ and $r = 0.36$, therefore, $p \geq 0.05$) between patients with Cholangitis Activity levels "0 or 1" and those with levels "2 or 3" in terms of 2-year AST values on PSC. However, at a significance level of 6% (i.e., $p < 0.06$; error margin of 6%), it could be argued that there is a statistically significant difference between PBC patients with levels "0 or 1" and those with "2 or 3". Nonetheless, when analyzing after excluding the 5 patients with overlapping syndrome with AIH, Cholangitis Activity "2 or 3" groups displayed higher serum levels of ALT and AST with statistical relevance ($p=0.021$ and $p=0.04$, respectively) in cases of PSC.

A statistically significant difference ($p = 0.049$; $Z = 1.991$ and $r = 0.43$) was noted in the distribution of serum ALP at 2 years between PBC patients with Nakanuma stage levels "1 or 2" and those with levels "3 or 4" (Table 6). Remarkably, these groups demonstrated ALP levels divided by the ULN at 1.01 and 1.75, respectively. In this context, stages "3 or 4" demonstrated no response to treatment over a span of 2 years, as per the Toronto criteria (serum ALP $> 1.67 \times$ ULN).

No statistically significant differences ($p \geq 0.05$) were observed regarding the two levels of each of the three parameters of the Nakanuma's classification in other biochemical variables and the age of the patients. The results also indicated the absence of statistically significant differences ($p \geq 0.05$) between male and female patients, considering only the PSC group patients. Due to the small number of male patients with PBC, the Mann-Whitney statistical test was not applied to the data.

4 DISCUSSION

There is limited research on the application of Nakanuma's classification system across diverse populations, particularly considering the unique characteristics and geographical variations in the presentation of PBC and PSC. Although it was originally validated for PBC, only three studies have extended its evaluation to PSC^{20,25,28}. Our study represents the first attempt to apply this classification system to the Brazilian population. We examined 32 cases of PBC and 36 cases of PSC, aiming to validate the findings observed in other populations within the Brazilian context.

In patients with PSC, we noted an association between Cholangitis Activity and serum levels of ALT and AST. Patients with Cholangitis Activity levels 2 or 3 displayed elevated serum ALT values compared to those with levels 0 or 1. This association was more pronounced when cases with AIH overlap were excluded, yielding higher mean values of ALT and AST at levels 2 or 3 in comparison to levels 1 or 2. The variability in statistics is likely linked to the enhanced prognosis observed in cases of overlap syndrome with AIH compared to classic PSC forms, due to response to corticosteroid therapy²⁹. Consequently, less hepatocyte damage is expected, contributing to the observed variation.

These findings support the effectiveness of Nakanuma cholangitis grading in evaluating hepatocellular necroinflammatory activity during biopsy in PSC — the first study to find this association. Although an expected outcome would be an increase in AST and ALT, markers of hepatocellular injury, in association with Hepatitis Activity, specifically in the forms of interface and/or lobular hepatitis on histology, our study only found correlation with Cholangitis Activity. This lack of alignment could be attributed to the heterogeneous distribution of lesions within the liver parenchyma. Notably, ductular aggression and ductopenia are associated with adjacent hepatitic inflammation, which may not have been adequately represented in the liver biopsy—a well-acknowledged limitation of the procedure³⁰. Moreover, hepatitis activity is generally mild in PSC, despite the eventual development of biliary cirrhosis over the course of the disease's natural history³¹.

Liver biopsy provides valuable prognostic information in patients with PBC that cannot be assessed through other methods. Fibrosis stands out as an independent prognostic factor, regardless of the biochemical response to UDCA, as demonstrated by Perez et al⁹. Furthermore, ductopenia is associated with treatment response and long-term histological progression¹⁰. Both variables are assessed using the Nakanuma classification staging, allowing for the individual risk stratification of each patient. In this context, accessing these variables at the time of diagnosis can be beneficial for predicting response and optimizing treatment.

In the PBC patient group, an association between higher Nakanuma stages and elevated serum levels of ALP was detected two years after the initiation of UDCA therapy. Employing

the Toronto Criteria, where $ALP > 1.67 \times ULN$ at 2 years post-UDCA initiation indicates a lack of biochemical response, it was concluded that stages 1 or 2 correlate with biochemical response (mean $ALP/ULN = 1.01$), while stages 2 or 3 showed no response to UDCA treatment (mean $ALP/ULN = 1.75$). Thus, the Nakanuma classification staging is associated with biochemical response and histological progression based on fibrosis and ductopenia in PBC, and consequently, with long-term prognosis^{10,32,45}. The same association was not observed for PSC.

Our study has several limitations, mostly due to the challenge of enrolling eligible patients for this study. Liver biopsy has become increasingly less necessary for diagnosing PSC and PBC, except in cases of overlap syndrome or those negative for AMA^{3,30}. Despite finding no association with Hepatitis or Cholangitic Activity, inflammation is correlated with an increased risk of fibrosis progression in PBC⁸, highlighting the need for a study with a larger sample size.

The absence of statistical relevance between serum ALP levels, total bilirubin and GGT in PSC might be attributed to the non-assessment of orcein-positive granule deposits. As Chan et al. (2014)²⁴ have suggested, these deposits are a key clinical staging parameter, partly due to their high interobserver consistency. Although the Nakanuma scoring is validated for use without orcein staining, this approach was not used in our PSC case study. Otherwise, the limited number of cases might have influenced these findings.

Importantly, while the Nakanuma's classification system has been extensively studied in Asian populations, it may not fully represent the more diverse Brazilian demographics. For example, Brazilian patients with PBC show a lower response to UDCA, and this is inversely associated with Ludwig's histological stage²⁷. This correlation was also observed in our study, employing both the Nakanuma system and the Toronto Criteria. Moreover, Brazilian PSC patients exhibit lower male predominance compared to Caucasians. Although women have an older age at diagnosis and increased survival, Nardelli et al.²⁶ did not find a survival increase related to sex. Thus, the lack of statistical association of the Nakanuma's classification system with variables like sex and age warrants further investigation in studies with a wider sample size.

5 CONCLUSION

This study reinforces the utility of the Nakanuma's classification system in evaluating histopathological changes in PBC and PSC within the Brazilian context. Our results emphasize noteworthy correlations between the histological staging of PBC and alkaline phosphatase levels, with higher stages exhibiting a correlation with a lack of response to ursodeoxycholic acid treatment. Additionally, this is the first study to establish an association between histological cholangitic activity and serum levels of aspartate and alanine

aminotransferase in PSC. The study stresses the need for further research into the nuance of the diseases' presentation based on the geographical variance of the patients and emphasizes the importance of context-specific approaches in the management and treatment of cholestatic liver diseases.

6 DATA AVAILABILITY

The data generated and analyzed during this study are available from the corresponding author upon request.

7 CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Lv T, Chen S, Li M, Zhang D, Kong Y, Jia J. Regional variation and temporal trend of primary biliary cholangitis epidemiology: A systematic review and meta-analysis. 2021 6;36(6):1423 – 1434.
- [2] Pullen R. A Clinical Review of Primary Biliary Cholangitis. 2020;43(2):E48 – E55.
- [3] COUTO CA, TERRABUIO DRB, CANÇADO ELR, PORTA G, LEVY C, SILVA AEB, et al. UPDATE OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY RECOMMENDATIONS FOR DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES OF THE LIVER. 2019 6;56(2):232 – 241.
- [4] Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, Chrétien Y, Andréani T, Johanet C, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. 2008 9;48(3):871 – 877.
- [5] Buddha M, Sanchez MM, Avila DJ, Romero JE, Romero A, Egwim C, et al. Assessment of Toronto Criteria for Response to Ursodiol Use Among PBC Patients in a Community Outpatient Setting; 2021. Available from: <http://journals.lww.com/ajg>.
- [6] Corpechot C, Carrat F, Bahr A, Chrétien Y, Poupon RE, Poupon R. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. 2005;128(2):297 – 303.
- [7] Goet JC, Perez CFM, Harms MH, Floreani A, Cazzagon N, Bruns T, et al. A Comparison of Prognostic Scores (Mayo, UK-PBC, and GLOBE) in Primary Biliary Cholangitis. 2021 7;116(7):1514 – 1522.
- [8] Degott C, Zafrani ES, Callard P, Balkau B, Poupon RE, Poupon R. Histopathological study of primary biliary cirrhosis and the effect of ursodeoxycholic acid treatment on histology progression. 1999;29(4):1007 – 1012.

- [9] Perez CFM, Hirschfield GM, Corpechot C, Floreani A, Mayo MJ, van der Meer A, et al. Fibrosis stage is an independent predictor of outcome in primary biliary cholangitis despite biochemical treatment response. 2019 11;50(10):1127 – 1136.
- [10] Kumagi T, Guindi M, Fischer SE, Arenovich T, Abdalian R, Coltescu C, et al. Baseline ductopenia and treatment response predict long-term histological progression in primary biliary cirrhosis. 2010 10;105(10):2186 – 2194.
- [11] Angulo P, Batts KP, Therneau TM, Jorgensen RA, Dickson ER, Lindor KD. Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis. 1999;29(3):644 – 647.
- [12] Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. Lancet (London, England). 2018 2;391:2547 – 2559.
- [13] Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. vol. 382; 2013. p. 1587 – 1599.
- [14] Broome U, Olsson R, Loof L, Bodemar G, Hultcrantz R, Danielsson A, et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. 1996 4;38(4):610 – 615.
- [15] Fricker ZP, Lichtenstein DR. Primary Sclerosing Cholangitis: A Concise Review of Diagnosis and Management; 2019.
- [16] Ponsioen CY, Chapman RW, Chazouillères O, Hirschfield GM, Karlsen TH, Lohse AW, et al. Surrogate endpoints for clinical trials in primary sclerosing cholangitis: Review and results from an International PSC Study Group consensus process. 2016 4;63(4):1357 – 1367.
- [17] Jabłońska J, Cielecka-Kuszyk J, Mikula T, Kozłowska J, Wiercińska-Drapała A. Hepatopathy of unknown etiology - Is liver biopsy a good tool in differential diagnosis? 2019;15(6):1462 – 1467.
- [18] Ludwig J, Dickson ER, McDonald GSA. Staging of Chronic Nonsuppurative Destructive Cholangitis (Syndrome of Primary Biliary Cirrhosis); 1978.
- [19] Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver biopsy interpretation. London; 2006.
- [20] Vries EMGD, Verheij J, Hubscher SG, Leeflang MMG, Boonstra K, Beuers U, et al. Applicability and prognostic value of histologic scoring systems in primary sclerosing cholangitis;.
- [21] Chan AWH, Chan RCK, Wong GLH, Wong VWS, Choi PCL, Chan HLY, et al. Evaluation of histological staging systems for primary biliary cirrhosis: correlation with clinical and biochemical factors and significance of pathological parameters in prognostication. 2014 8;65(2):174 – 186.
- [22] Hiramatsu K, Aoyama H, Zen Y, Aishima S, Kitagawa S, Nakanuma Y. Proposal of a new staging and grading system of the liver for primary biliary cirrhosis. 2006 11;49(5):466 – 478.

- [23] Nakanuma Y, Zen Y, Harada K, Sasaki M, Nonomura A, Uehara T, et al. Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement. 2010 3;60(3):167 – 174.
- [24] Chan AWH, Chan RCK, Wong GLH, Wong VWS, Choi PCL, Chan HLY, et al. Evaluation of histological staging systems for primary biliary cirrhosis: Correlation with clinical and biochemical factors and significance of pathological parameters in prognostication. 2014;65(2):174 – 186.
- [25] Vries EMGD, Krijger MD, Arkkilä MF, Arola J, Schirmacher P, Gotthardt D, et al. Validation of the Prognostic Value of Histologic Scoring Systems in Primary Sclerosing Cholangitis: An International Cohort Study. 2016; Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28963>.
- [26] Nardelli MJ, Bittencourt PL, Cançado GGL, Faria LC, Villela-Nogueira CA, Rotman V, et al. Clinical Features and Outcomes of Primary Sclerosing Cholangitis in the Highly Admixed Brazilian Population. 2021 11;2021:1 – 8.
- [27] Cançado GGL, Braga MH, Ferraz MLG, Villela-Nogueira CA, Terrabuio DRB, Cançado ELR, et al. Clinical features and treatment outcomes of primary biliary cholangitis in a highly admixed population. 2022 1;27(1).
- [28] Sjöblom N, Boyd S, Kautiainen H, Arola J, Färkkilä M. Novel histological scoring for predicting disease outcome in primary sclerosing cholangitis. 2022 8;81(2):192 – 204.
- [29] Ballotin VR, Bigarella LG, Riva F, Onzi G, Balbinot RA, Balbinot SS, et al. Primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis overlap syndrome associated with inflammatory bowel disease: A case report and systematic review. 2020 9;8(18):4075 – 4093.
- [30] Neuberger J, Patel J, Caldwell H, Davies S, Hebditch V, Hollywood C, et al. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice from the British Society of Gastroenterology, the Royal College of Radiologists and the Royal College of Pathology. 2020 8;69(8):1382 – 1403.
- [31] Nakanuma Y, Harada K, Katayanagi K, Tsuneyama K, Sasaki M. Definition and pathology of primary sclerosing cholangitis. 1999 12;6(4):333 – 342.
- [32] Kowdley KV. An Examination of the Evidence Behind Biochemical Markers in Primary Biliary Cholangitis; 2021.

TABLE 1. Scoring of primary biliary cirrhosis

Score	Scoring of fibrosis	Scoring of bile duct loss	Scoring of deposition of orcein-positive granules
0	No portal fibrosis. or fibrosis limited to portal tracts	No bile duct loss	No deposition of granules
1	Portal fibrosis with periportal fibrosis or incomplete septal fibrosis	Bile duct loss in <1/3 of portal tracts	Deposition of granules in several periportal hepatocytes in <1/3 of portal tracts
2	Bridging fibrosis with variable lobular disarray	Bile duct loss in 1/3-2/3 of portal tracts	Deposition of granules in variable periportal hepatocytes in 1/3-2/3 of portal tracts
3	Liver cirrhosis with regenerative nodules and extensive fibrosis	Bile duct loss in >2/3 of portal tracts	Deposition of granules in many hepatocytes in >2/3 of portal tracts

Note: Adapted from “Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement” by Y. Nakanuma et al, 2010. Pathology International 60, p. 167-174. Copyright 2010 by Wiley.

TABLE 2. Staging of primary biliary cirrhosis

Stage	Sum of score: fibrosis, bile duct loss and deposition of orcein-positive granules	Sum of score: bile duct loss and fibrosis
1 (<i>no progression</i>)	0	0
2 (<i>mild progression</i>)	1-3	1-2
3 (<i>moderate progression</i>)	4-6	3-4
4 (<i>advanced progression</i>)	7-9	5-6

Note: Adapted from “Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement” by Y. Nakanuma et al, 2010. Pathology International 60, p. 167-174. Copyright 2010 by Wiley.

TABLE 3. Grading of necroinflammatory activity of primary biliary cirrhosis (revised after analysis of interobserver agreement)

Cholangitis Activity	
CA 0 (<i>no activity</i>)	No cholangitis activity, but mild duct epithelial damage may be present
CA 1 (<i>mild activity</i>)	One evident chronic cholangitis activity in the specimen
CA 2 (<i>moderate activity</i>)	More than two bile ducts with evident chronic cholangitis
CA 3 (<i>marked activity</i>)	At least one CNSDC in the specimen
Hepatitis Activity	
HA 0 (<i>no activity</i>)	No interface hepatitis, and no or minimum lobular hepatitis
HA 1 (<i>mild activity</i>)	Interface hepatitis affecting 10 continuous hepatocytes in one portal tract or fibrous septa, and mild—moderate lobular hepatitis
HA 2 (<i>moderate activity</i>)	Interface hepatitis affecting 10 continuous hepatocytes in more than two portal tracts or fibrous septa, and mild—moderate lobular hepatitis
HA 3 (<i>marked activity</i>)	Interface hepatitis affecting 20 continuous hepatocytes in more than half of the portal tracts, and moderate lobular hepatitis. or bridging or zonal necrosis

CNSDC, chronic non-suppurative destructive cholangitis; **CA**, Cholangitis Activity; **HA**, Hepatitis Activity.

Note: Adapted from “Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement” by Y. Nakanuma et al, 2010. Pathology International 60, p. 167-174. Copyright 2010 by Wiley.

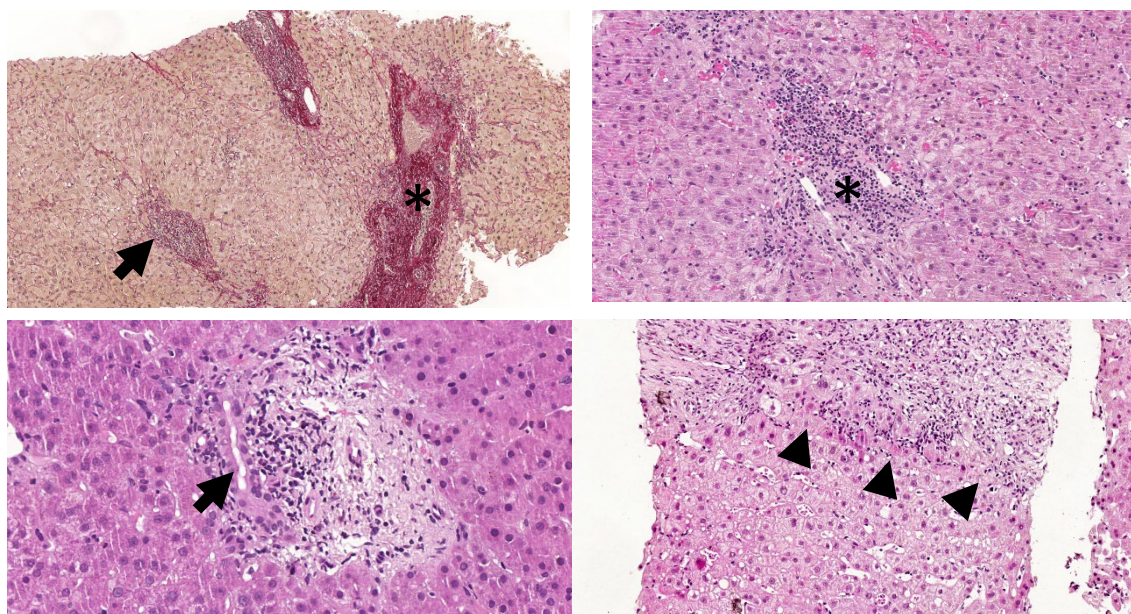


Figure 1. Examples of histological findings relevant to the Nakanuma score. A. Bridging fibrosis (asterisk) and portal fibrosis (arrow) corresponding to a fibrosis score of 2 (Picro-Sirius, original magnification x100). B. Portal tract (asterisk) with lymphocytic inflammatory infiltrate, without evident bile duct (HE, original magnification x200). C. Chronic cholangitis (arrow) with mild periductal lymphocytic infiltrate associated (HE, original magnification x200). D. Limiting plate (arrowhead) displaying interface hepatitis affecting at least 10 hepatocytes (HE, original magnification x200).

TABLE 4. Clinical and Laboratory Parameters, and Distribution of Nakanuma Scores in PSC and PBC Groups

Variable	Study group			
	PSC		PBC	
	n	%	n	%
Sex				
Male	24	66.7	2	6.3
Female	12	33.3	30	93.8
TOTAL	36	100.0	32	100.0
Age (years)	(n = 36)		(n = 32)	
Mean $\pm$ s.d	35.7 $\pm$ 14.7		58.2 $\pm$ 12.6	
Classic Form				
Yes	26	74.3	24	75.0
No	9	25.7	8	25.0
TOTAL	35	100.0	32	100.0
Overlap Syndrome				
Yes	7	19.4	8	25.0
No	29	80.6	24	75.0
TOTAL	36	100.0	32	100.0
Small ducts				
Yes	4	11.1	—	—
No	32	89.9	—	—
TOTAL	36	100.0	—	—
AST (U/l; 2 years)	(n = 29)		(n = 21)	
Mean $\pm$ s.d	88.6 $\pm$ 80.9		40.5 $\pm$ 22.9	

s.d., standard deviation; PSC, Primary Sclerosing Cholangitis; PBC, Primary Biliary Cholangitis.

TABLE 4. Clinical and Laboratory Parameters, and Distribution of Nakanuma Scores in PSC and PBC Groups (Continued)

Variable	Study group			
	PSC		PBC	
	n	%	n	%
ALT (U/l; 2 years)	(n = 31)		(n = 21)	
<i>Mean ± s.d</i>	92.9 ± 81.4		37.4 ± 30.4	
ALP (U/l; 2 years)	(n = 29)		(n = 21)	
<i>Mean ± s.d</i>	344.7 ± 305.4		180.5 ± 160.5	
ALP/ULN (2 years)	(n = 29)		(n = 21)	
<i>Mean ± s.d</i>	2.74 ± 2.42		1.43 ± 1.27	
ALP/ULN Range (2 years)				
<i>< 1.67</i>	12	41.4	16	76.2
<i>≥ 1.67</i>	17	58.6	5	23.8
TOTAL	29	100.0	21	100.0
Total bilirubin (µmol/l; 2 years)	(n = 28)		(n = 18)	
<i>Mean ± s.d</i>	2.10 ± 3.68		0.74 ± 0.45	
GGT/ULN (2 years)	(n = 31)		(n = 19)	
<i>Mean ± s.d</i>	3,68 ± 4,76		5,83 ± 8,23	

s.d., standard deviation; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase. GGT, Gamma-glutamyl transferase; ULN, upper limit of normal; PSC, Primary Sclerosing Cholangitis; PBC, Primary Biliary Cholangitis.

TABLE 4. Clinical and laboratorial parameters and Nakanuma score distribution of the PSC and PBC groups (Continued)

Variable	Study group			
	PSC		PBC	
	n	%	n	%
<u>NAKANUMA SCORE</u>				
Stage				
<i>1</i>	3	8.3	2	6.3
<i>2</i>	10	27.8	11	34.4
<i>3</i>	17	47.2	10	31.2
<i>4</i>	6	16.7	9	28.1
TOTAL	36	100.0	32	100.0
Cholangitis Activity				
<i>0</i>	7	19.4	4	12.5
<i>1</i>	16	44.5	8	25.0
<i>2</i>	7	19.4	11	34.4
<i>3</i>	6	16.7	9	28.1
TOTAL	36	100.0	32	100.0
Hepatitis Activity				
<i>0</i>	14	38.9	14	43.7
<i>1</i>	9	25.0	7	21.9
<i>2</i>	12	33.3	6	18.8
<i>3</i>	1	2.8	5	15.6
TOTAL	36	100.0	32	100.0

PSC, Primary Sclerosing Cholangitis; PBC, Primary Biliary Cholangitis.

TABLE 5. Descriptive and comparative analysis between the Nakanuma's histological classification and clinical and biochemical parameters in the PSC group

	PSC GROUP														
	ALT (U/l)			ALT-OS (U/l)			AST (U/l)			AST-OS (U/l)			ALP (U/l)		
	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>
Stage 1/2	10	76	53.3	8	79	56.6	9	91.8	84.8	8	66.5	42	9	380.1	428.1
Stage 3/4	21	101	91.9	16	82.6	69.2	20	100.6	91.8	15	73.7	46.8	20	328.8	243.9
	p = 0.852			p = 0.834			p = 0.340			p = 0.825			p = 0.945		
Cholangitis Activity 0/1	18	72.5	71.1	15	59.1	49.4	17	73.2	84	15	56.3	35.9	17	268.5	191.2
Cholangitis Activity 2/3	13	121.2	88.8	9	118.6	71	12	110.3	74.3	8	99.1	47.4	12	452.7	403.2
	p = 0.046			p = 0.021			p = 0.053			p = 0.040			p = 0.419		
Hepatitis Activity 0/1	19	96.8	79	16	88.9	68.2	18	91.7	84.5	16	78.4	49	18	385.8	343.3
Hepatitis Activity 2/3	12	86.8	88.3	8	66.3	55.9	11	83.5	78.4	7	54.7	27.6	11	277.5	229.8
	p = 0.617			p = 0.528			p = 0.247			p = 0.452			p = 0.438		

PSC, Primary Sclerosing Cholangitis; **ALT**, alanine aminotransferase; **ALT-OS**, alanine aminotransferase removing cases of overlap syndrome; **AST**, aspartate aminotransferase; **AST-OS**, aspartate aminotransferase removing cases of overlap syndrome; **ALP**, alkaline phosphatase; **s.d.**, standard deviation.

TABLE 5. Descriptive and comparative analysis between the Nakanuma's histological classification and clinical and biochemical parameters in the PSC group (continued)

	PSC GROUP													
	ALP/ULN			GGT/ULN			TB ($\mu\text{mol/l}$)			Age (years)			Sex	
	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>M</i>	<i>F</i>
Stage 1/2	9	3.02	3.4	11	2.87	3.8	8	1.06	0.42	13	34.5	15.4	9	4
Stage 3/4	20	2.61	1.94	20	4.14	5.24	20	2.51	4.3	23	36.4	14.6	15	8
	p = 0.945			p = 0.381			p = 0.709			p = 0.580			p = 0.608	
Cholangitis Activity 0/1	17	2.13	1.52	19	3.82	5.35	15	1.1	0.66	23	34.7	14.4	14	9
Cholangitis Activity 2/3	12	3.59	3.2	12	3.47	3.83	13	3.25	5.21	13	37.5	15.7	10	3
	p = 0.419			p = 0.734			p = 0.201			p = 0.673			p = 0.416	
Hepatitis Activity 0/1	18	3.06	2.72	20	3.92	5.43	18	1.7	1.99	23	36.8	16.2	16	7
Hepatitis Activity 2/3	11	2.2	1.82	11	3.26	3.38	10	2.81	5.97	13	33.8	12.1	8	5
	p = 0.438			p = 0.761			p = 0.724			p = 0.745			p = 0.987	

PSC, Primary Sclerosing Cholangitis; ALP/ULN, alkaline phosphatase divided by upper limit of normal; GGT/ULN, gamma-glutamyltransferase divided by upper limit of normal; TB, total bilirubin; s.d., standard deviation.

TABLE 6. Descriptive and comparative analysis between the Nakanuma's histological classification and clinical and biochemical parameters in the PBC group

	PBC GROUP											
	ALT (U/l)			ALT-OS (U/l)			AST (U/l)			AST-OS (U/l)		
	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>
Stage 1/2	9	37.4	39.5	6	46.5	46.8	9	38.4	28.6	6	45.8	33.3
Stage 3/4	12	37.4	23.3	9	41.3	25.8	12	42	18.8	9	44.4	21.3
		p = 0.247			p = 0.607			p = 0.247			p = 0.766	
Cholangitis Activity 0/1	9	35	27.7	7	40	29.9	9	40.3	21.7	7	45	22.7
Cholangitis Activity 2/3	12	39.3	33.3	8	46.4	39.4	12	40.6	24.7	8	45	29.5
		p = 0.754			p = 0.955			p = 0.972			p = 0.779	
Hepatitis Activity 0/1	15	41	34.8	12	46.4	37.2	15	42.9	25.6	12	47.7	26.7
Hepatitis Activity 2/3	6	28.5	12.7	3	31.3	17.9	6	34.5	13.9	3	34.3	21.6
		p = 0.970			—			p = 0.791			—	

PBC, Primary Biliary Cholangitis; **ALT**, alanine aminotransferase; **ALT-OS**, alanine aminotransferase removing cases of overlap syndrome; **AST**, aspartate aminotransferase; **AST-OS**, aspartate aminotransferase removing cases of overlap syndrome; **s.d.**, standard deviation.

TABLE 6. Descriptive and comparative analysis between the Nakanuma's histological classification and clinical and biochemical parameters in the PBC group (continued)

	PBC GROUP											
	ALP (U/l)			GGT/ULN			TB (μmol/l)			Age (years)		
	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>s.d.</i>
Stage 1/2	9	127.9	117.2	8	4.22	5.5	8	0.66	0.44	13	58	15.2
Stage 3/4	12	220	181.3	11	6.99	9.85	10	0.81	0.46	19	58.4	10.9
	p = 0.049			p = 0.840			p = 0.315			p = 1		
Cholangitis Activity 0/1	9	255.1	202.2	6	9.16	10.45	9	0.69	0.25	12	56.2	12.6
Cholangitis Activity 2/3	12	124.6	95.5	13	4.29	6.92	9	0.8	0.59	20	59.5	12.8
	p = 0.382			p = 0.179			p = 0.796			p = 0.687		
Hepatitis Activity 0/1	15	209.7	182.4	13	7.86	9.31	14	0.67	0.37	21	58	12.8
Hepatitis Activity 2/3	6	107.5	29.7	6	1.42	1.19	4	1	0.66	11	58.6	12.8
	p = 0.970			p = 0.072			p = 0.327			p = 1		

PBC, Primary Biliary Cholangitis; **ALP**, alkaline phosphatase; **GGT/ULN**, gamma-glutamyl transferase divided by upper limit of normal; **TB**, total bilirubin; **s.d.**, standard deviation.