

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE
PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO
DOS FATORES IMUNOFENOTÍPICOS**

Priscila Menezes Ferri Liu

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2016

Priscila Menezes Ferri Liu

**HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE
PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO
DOS FATORES IMUNOFENOTÍPICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Coorientador: Profa. Débora Marques de Miranda

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor: Prof. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Ana Cristina Côrtes Gama

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Cláudia Regina Lindgren Alves

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Coordenador: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Subcoordenador: Prof. Jorge Andrade Pinto

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Prof^a. Ana Cristina Simões e Silva – Titular

Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz - Suplente

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira - Titular

Prof^a. Eleonora Moreira Lima - Suplente

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira - Titular

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina - Suplente

Prof. Jorge Andrade Pinto - Titular

Profª Helena Maria Gonçalves Becker – Suplente

Profª. Juliana Gurgel – Titular

Profª Ivani Novato Silva - Suplente

Profª. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana – Titular

Profª Luana Caroline dos Santos - Suplente

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular

Prof. Marcos José Burle de Aguiar - Suplente

Profª Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular

Profª. Débora Marques de Miranda - Suplente

Suelen Rosa de Oliveira – Discente Titular

Izabel Vasconcelos Barros Poggiali – Discente Suplente

Dedico este trabalho a meus pais que sempre ensinaram-me a importância do aprender.

Agradecimentos

É sempre um desafio agradecer a todos da forma como desejamos através das palavras. Minha vontade é prestar uma homenagem singular a cada um, mas tentarei com esta mensagem expressar meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar, iluminar e me dar a força e a saúde que precisei para chegar até aqui.

Agradeço também meus pais, Sr. Marcelo e Sra. Geralda Margarete, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, estando sempre presentes e ensinando-me a coragem para prosseguir e fazer o meu melhor.

Às minhas irmãs, Natalia e Raissa, que entenderam minha ausência em muitos momentos e me ajudaram sempre que precisei a cuidar do Bruno, meu filho, mesmo quando estavam cansadas, mas sempre alegres e divertidas. Por fazerem parte também dos momentos de descontração em que pude aliviar as tensões relacionadas ao trabalho.

Ao meu exemplo de pessoa, profissional e professor, Alexandre por ter me conduzido desde minha formação como estudante de medicina até a presente conquista do doutorado, com dedicação, paciência, compreensão e humildade. Seu incentivo constante foi a chave para meu trabalho ter chegado até aqui.

À professora Débora, minha querida co-orientadora, pela disponibilidade para me ajudar, pelas horas dedicadas a discussões de temas diversos mesmo que não relacionados à tese, por ter pacientemente lido meus inúmeros e-mails para tirar dúvidas e mais dúvidas, fazer correções de escrita, gramática e conteúdo de toda a tese. E, além disso, pela confiança em apoiar financeiramente este projeto através do laboratório do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular.

Não posso deixar de agradecer também dois grandes exemplos que fizeram parte desse trabalho, com muita competência e carinho. Professora Eleonora, que me apresentou ao projeto e me deu todas as ferramentas para começar e caminhar nesta pesquisa. Não mediu esforços para que tudo desse certo. Professora Mariza, exemplo de pessoa e profissional, cuidando não só dos pacientes, mas também de toda a equipe de Hepatologia Pediátrica.

Agradeço também a professora Ana Cristina Simões e Silva, por ter me incentivado a todo o momento a continuar e por me mostrar como é possível crescer e trabalhar com pesquisa apesar das dificuldades que existem em nosso país.

Agradeço ainda à professora Karen por todos os ensinamentos sobre a metodologia de pesquisa, citometria e por todo cuidado que me mostrou ter ao realizar qualquer coisa. Você foi e será sempre um exemplo a seguir! Agradeço ainda à Érica que também me deu todo o suporte científico e ajuda que necessitei no processo complexo da realização das avaliações laboratoriais.

Não posso deixar de agradecer também a todos os membros do grupo de Gastroenterologia Pediátrica que em muitos momentos me ajudaram de diversas formas. Especialmente a professora Maria do Carmo que, com carinho de mãe, sempre me apoiou e incentivou; e à Ana Paula, residente praticamente formada, que me possibilitou fazer todas as análises estatísticas me emprestando seu computador n^{10} vezes ao longo desses últimos dois anos.

Meu reconhecimento sincero também aos alunos de iniciação científica, Soraya, Diego, Gisele e Isabela, com quem muito aprendi e que participaram junto a mim dos bons e maus momentos na execução desse projeto. Em especial à Soraya, que não mediu esforços para me ajudar, fazendo, corrigindo e refazendo análises, bancos de dados e textos; e à Gisele que com muita delicadeza me ensinou os passos da citometria.

Agradeço também à Beverly, ao Shinjen, à Maria Teresa, à Priscilla e ao Vitor que, como família e amigos, de diversas formas estiveram presentes durante esses anos de trabalho, e sempre me apoiaram.

Por fim, agradeço ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, FAPEMIG e CNPq que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Agradecimento especial

Ao meu filho, Bruno e ao meu marido, Shinfay por toda a ajuda ao longo dessa caminhada, por entenderem os momentos em que precisei me dedicar aos estudos e por me aguentarem nos momentos de maior estresse e ansiedade, depois de noites mal dormidas, entendendo a importância desse trabalho para mim. Shinfay, você foi pessoa que mais me deu forças para continuar. Bruninho, você é a alegria da minha vida.

Obrigada!

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha”

Confúcio

NOTA EXPLICATIVA

A presente tese foi organizada sob a forma de artigos, de acordo com a resolução 03/2010 de 05/02/2010 do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (disponível em: [resolucao_03_2010_regulamenta_formato_de_teses_e_dissertacoes.pdf](#)). Este trabalho faz parte dos projetos de pesquisa sobre Hepatite autoimune e Colangite esclerosante primária em crianças e adolescentes desenvolvido pelo grupo de Hepatologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os projetos têm objetivos amplos de estudar, avaliar e entender vários aspectos relacionados a estas doenças. Na presente tese, o primeiro artigo já publicado, consiste em uma revisão da literatura na qual são discutidos os principais aspectos e achados recentes sobre a pesquisa de fatores genéticos e imunofenotípicos na hepatite autoimune em crianças e adolescentes. O segundo artigo trata da revisão de literatura em relação aos fatores genéticos e imunofenotípicos relacionados à colangite esclerosante primária. O terceiro e o quarto artigos, assim como os resultados complementares, objetivos primários do presente estudo, tiveram como foco a descrição de fatores imunofenotípicos em crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite autoimune e colangite esclerosante primária. As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção. Para as citações do texto foi utilizado o sistema denominado Vancouver, elaborado por um grupo de editores das principais publicações biomédicas internacionais na cidade de Vancouver, no Canadá, em 1979 e atualizado em 2004 (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* - www.ICMJE.org). Foram seguidas ainda as recomendações específicas dos periódicos para os quais os artigos serão submetidos.

LISTA DE FIGURAS
Seção: PACIENTES E MÉTODOS

Propedêutica complementar:

Figura 1- Dot-plot representando o método de seleção de *gates* utilizados para linfócitos em A e de monócitos em B ----- 56

Seção: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo original 1:

Figura 1- Percentage total of CD4⁺ T cells in PBMC with representation of median and interquartile range 25-75th ----- 69

Figura 2- Percentage total of CD8⁺ T cells in PBMC with representation of median and interquartile range 25-75th ----- 70

Figura 3- Percentage total of CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC with representation of median and interquartile range 25-75th ----- 70

Figura 4- 4.A: Expression of CCR3 in CD4⁺ T cells in PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation. 4.B: Expression of CCR3 in CD8⁺ T cells in PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation ----- 75

Figura 5- Expression of CD45RA and CD45RO in T cells of PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation. 5.A: Expression of CD45RA in CD4⁺ T cells. 5.B: Expression of CD45RO in CD4⁺ T cells. 5.C: Expression of CD45RA in CD8⁺ T cells. 5.D: Expression of CD45RO in CD8⁺ T cells ----- 76

Figura 6- Expression of CD28 and CD25 in T cells in PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation. 6.A: Expression of CD28 in CD4⁺ T cells in PBMC. 6.B: Expression of CD25 in CD8⁺ T cells in PBMC ----- 77

Figure 7- Expression of HLA-DR in CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC with median and interquartile range 25-75th representation ----- 77

Artigo original 2:

Figura 1- Percentage of CD4⁺ T cells in PBMC of PSC and control patients with median and interquartile range 25-75th representation ----- 95

Figura 2- Percentage of CD8⁺ T cells in PBMC of PSC and control patients with median and interquartile range 25-75th representation ----- 95

Figura 3- Percentage of CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC of PSC and control patients with median and interquartile range 25-75th representation ----- 96

Figura 4- Expression of CCR3 (A), CD25 (B), CD95L (C) and CTLA-4 (D) in CD4⁺ T cells in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation ----- 99

Figura 5- Expression of CD40L (A) and HLA-DR (B) in CD4⁺ T cells in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation ----- 99

Figura 6- Percentage of CD4⁺ T cells not expressing CD28 in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation- 100

Figura 7- Expression of CCR3 (A) and CD69 (B) in CD8⁺ T cells in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation- 100

Figura 8- Expression of CD80 in CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range (25-75th) representation----- 101

Resultados e discussão complementares:

Figura 1- Expressão de CD4 em linfócitos em sangue periférico (PBMC) em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 ----- 119

Figura 2- Expressão de CCR3 em células T CD4⁺ (A) e em células T CD8⁺ (B) em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 ----- 119

Figura 3- Expressão de CD45RO em células T CD4⁺ em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 -----120

- Figura 4- Expressão de CD25 em células T CD4⁺ em PBMC em A e expressão de CD95L em células T CD4⁺ em PBMC em B, em todos os grupos, com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 -----121
- Figura 5- Expressão de CTLA-4 em células T CD4⁺ em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 -----121
- Figura 6- Expressão de CD40L em células T CD4⁺ em PBMC em A e expressão de CD69 em células T CD8⁺ em PBMC em B, em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 -----122
- Figura 7- Expressão de HLA-DR em células CD14⁺ (monócitos) em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75 -----122

LISTA DE TABELAS

Seção: REVISÃO DA LITERATURA

Artigo de revisão 1:

Tabela 1- Autoantibodies studies and their findings ----- 28

Tabela 2- Major histocompatibility complex class II human leukocyte antigen and its association with autoimmune hepatitis patients ----- 29

Artigo de revisão 2:

Tabela1- Major histocompatibility class II human leukocyte antigens and its association with primary sclerosing cholangitis patients ----- 39

Seção: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo original 1:

Tabela 1- Comparison of the main clinical, laboratory and evolution features of two groups of patients with AIH and AIH in association with autoimmune cholangitis (overlap syndrome) ----- 67

Tabela 2- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in all groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD4⁺ T cells -----71

Tabela 3- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in all groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD8⁺ T cells -----73

Tabela 4- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in all groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD14⁺ cells (monocytes) -----74

Artigo original 2:

Tabela 1- Results of median and interquartile range (IQ25-75th) of percentage of expression of surface markers in the two groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD4⁺ T cells ----- 97

Tabela 2- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in the two groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD8⁺ T cells ----- 98

Table 3 - Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in the two groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD14⁺ cells (monocytes) ----- 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIH - Autoimmune hepatitis
- ALP - Alkaline phosphatase
- ALT - Alanina aminotransferase ou alanine aminotransferase
- AML - Anti-músculo liso
- ANA - Antinuclear antibody
- ANCA - Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
- Anti-LKM1 - Antimicrosomal de fígado e rim ou liver kidney microsomal type 1
- APC - Allophycocyanin
- ASCA - Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies
- ASMA- Anti-smooth muscle antibody
- AST - Aspartato aminotransferase ou aspartate aminotransferase
- CAI - Colangite autoimune
- CD - Cluster of differentiation
- CEP - Colangite esclerosante primária
- CTLA-4 - Cytotoxic T lymphocyte associated protein-4
- Cy- Cyanin
- FA - Fosfatase alcalina
- FAN - Fator antinuclear
- FITC – Fluorescein isothiocyanate
- GGT - Gamaglutamil transferase ou gamma-glutamyl transferase
- HAI - Hepatite autoimune
- HAV - Vírus da hepatite A
- HBsAg -Antígeno do vírus da hepatite B
- HCV - Vírus da hepatite C
- HLA - Antígeno leucocitário humano ou human leukocyte antigen
- IBD - Inflammatory bowel disease
- IFI - Imunofluorescência indireta
- IFN- γ - Interferon gamma
- IgG- Immunoglobulin G
- IL- Interleukin
- IQ- Interquartile range
- MAdCAM-1- Mucosal addressin cell adhesion molecule 1

MHC II - Major histocompatibility complex II
MRC- Magnetic resonance cholangiography
MRI- Magnetic resonance image
NK - Natural killer
PAMPs- Pathogen-associated molecular pattern
PBMC- Peripheral blood mononuclear cells
PE - Phycoerythrin
PSC- Primary sclerosing cholangitis
RV - Reference value
Teff - Effector T lymphocyte
TGF- β – Transforming growth factor-beta
TLR- Toll-like receptors
TNF- α - Tumor necrosis factor-alfa
Treg - Regulatory T lymphocyte
UC - Ulcerative colitis
UDCA- Ácido ursodesoxicólico ou ursodeoxycholic acide
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO GERAL

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado, rara em crianças e adolescentes, que predomina no sexo feminino, com ampla gama de manifestações clínicas. O mecanismo fisiopatológico da doença não é completamente conhecido, o que limita a criação de exames laboratoriais e tratamentos mais específicos. A colangite esclerosante primária (CEP), na faixa etária pediátrica, é um de seus principais diagnósticos diferenciais. Sobre essa última, são menos conhecidos ainda os mecanismos fisiopatológicos, não havendo um tratamento que melhore de forma significativa o curso da doença.

Neste estudo, o objetivo foi descrever o perfil imunofenotípico de pacientes com hepatite autoimune tipo 1, hepatite autoimune tipo 1 associada à colangite e colangite esclerosante primária avaliando também fatores clínicos e laboratoriais em uma coorte de crianças e adolescentes acompanhados no ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG.

Para tal, foi realizado acompanhamento clínico-laboratorial longitudinal dos pacientes e avaliado o perfil imunofenotípico desses através de marcadores de superfície celular - *clusters of differentiation* (CD). Os dados foram registrados em prontuários próprios e compilados também em banco de dados eletrônico. A análise estatística incluiu a descrição da amostra com relação a fatores clínicos e laboratoriais gerais e a avaliação de marcadores fenotípicos de linfócitos e monócitos relacionados à inflamação e a autoimunidade.

Os resultados deste trabalho foram relatados em dois artigos e uma seção de resultados complementares. No primeiro artigo original, abordou-se a avaliação de dados encontrados em pacientes com diagnóstico de hepatite autoimune tipo 1 e sua associação com colangite. Os pacientes apresentaram características clínicas e laboratoriais semelhantes entre si, com exceção para resultados de gamaglutamil transferase (GGT) e gamaglobulinemia. Pacientes dos dois grupos tiveram maior porcentagem de células T CD4⁺. Na avaliação fenotípica de linfócitos T CD4⁺, a expressão de CCR3 foi maior em ambos os grupos pacientes, de CD45RA também foi alta em ambos os grupos pacientes, mas com significância apenas no grupo de associação com colangite, e de CD45RO e CD28 foi maior no grupo da HAI. Em linfócitos T CD8⁺, a expressão de CCR3 foi mais elevada em ambos os grupos e nos pacientes do grupo de associação à colangite encontramos uma expressão maior de

CD25 e CD45RA e inferior de CD45RO. Em monócitos, HLA-DR foi o achado mais importante, sendo menos expresso em ambos os grupos de pacientes.

Já no segundo artigo, foi avaliado o perfil do grupo com diagnóstico de colangite esclerosante primária, com descrição da amostra e comparação de fatores imunofenotípicos com grupo controle.

Observou-se que os pacientes tinham uma idade mediana 13.0 anos, com predomínio do sexo masculino (1.4: 1) e que a elevação da gamaglutamil transferase foi o achado laboratorial mais importante na avaliação inicial. Estas características se assemelharam às apresentadas em outras casuísticas pediátricas disponíveis na literatura. Apesar de reduzida contagem total de linfócitos no sangue periférico, os pacientes apresentavam uma maior percentagem de células T CD4⁺ em comparação aos controles. Na imunofenotipagem de células T CD4⁺ foi mais elevada a expressão de CCR3, CD25, CD95L, CD40L, HLA-DR e houve também maior percentagem de células CD28 negativas. Em linfócitos T CD8⁺, CD69 e CCR3 foram mais expressos. Em monócitos, houve um aumento da expressão de CD80. Os resultados demonstraram que crianças e adolescentes com diagnóstico de CEP apresentam uma ativação persistente do sistema imune, com mecanismo complexo com participação alterações em receptores e marcadores celulares. Mais pesquisas são necessárias para identificar possibilidades diagnósticas e terapêuticas relacionadas a estes marcadores.

Na seção complementar foi realizada a comparação entre os grupos de pacientes com diagnóstico de HAI e CEP. Nessa avaliação, ficou evidente a maior expressão de marcadores relacionados a autoimunidade nos pacientes com diagnóstico de CEP, como CD25, CTLA-4, CD95L, CD69, CD40L em células T CD4⁺. Hipotetiza-se que esses achados poderiam estar relacionados às diferentes fisiopatologias dessas doenças ou à resposta ao tratamento observada na HAI. Em monócitos, observou-se menor expressão de HLA-DR nos pacientes com diagnóstico de HAI, sendo esse um achado importante pois já é conhecida a participação do HLA na predisposição genética dessa doença. É possível que um fenótipo mal funcionante do HLA-DR possa fazer da fisiopatologia. Ademais, observamos também interessante característica semelhante entre as duas doenças com a maior expressão de CCR3, marcador já descrito em outras situações de autoimunidade, com possível importância no mecanismo fisiopatológico. Por fim, os autores buscaram colaborar para um melhor entendimento da imunofenotipagem celular das doenças estudadas e também buscaram encontrar fatores que poderiam auxiliar no diagnóstico e tratamento de ambas.

SUMÁRIO

1 – Introdução -----	19
2 – Revisão da Literatura -----	26
2.1 - Artigo de revisão 1: “Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors”-----	26
2.2 - Artigo de revisão 2: “The role of genetic and immune factors for the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis in childhood”-----	35
3 – Objetivos -----	52
4 – Pacientes e Métodos -----	52
4.1 – Delineamento, população, local e período do estudo-----	52
4.2 – Aspectos éticos -----	53
4.3 – Avaliação clínica-----	53
4.4 – Propedêutica complementar-----	54
4.5 – Resposta ao tratamento-----	57
4.6 – Análise estatística -----	58
5 – Resultados e Discussão -----	60
5.1 - Artigo original 1: " Autoimmune hepatitis and overlap syndrome with cholangitis: immunophenotypic factors in children and adolescents" -----	60
5.2 - Artigo original 2: “Primary sclerosing cholangitis: immunophenotypic factors in children and adolescents.” -----	87
5.3 - Resultados e discussão complementares: “Avaliação comparativa de achados imunofenotípicos em crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite autoimune e colangite esclerosante primária” -----	114
6 – Comentários finais -----	127
7 – Anexos -----	129

1- INTRODUÇÃO

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado, rara em crianças e adolescentes e que acomete um grupo de pacientes que perderam a tolerância imunológica a antígenos do próprio fígado.^{1,2,3} Predomina no gênero feminino e caracteriza-se por hipergamaglobulinemia, elevação de enzimas hepáticas, presença de autoanticorpos e alterações histológicas.⁴ A idade de início dos sintomas é ampla, variando de 6 meses a 75 anos, sendo rara antes dos dois anos e possuindo incidência maior entre 10 e 30 anos.²

O diagnóstico é confirmado por meio desses achados e da exclusão de outras causas de doença hepática crônica.⁵ De acordo com os autoanticorpos detectados, a HAI pode ser classificada em duas formas: HAI tipo 1 quando são detectados os autoanticorpos fator antinuclear (FAN) e/ou antimúsculo liso (AML); e HAI tipo 2 se detectado autoanticorpo antimicrosomal de fígado e rim (anti-LKM1).⁵ A biópsia hepática faz parte da confirmação diagnóstica e avaliação da presença ou ausência de cirrose. A histologia tem como achados sugestivos a presença de necrose em sacabocado periportal ou perisseptal, infiltrado linfoplasmocitário com numerosos plasmócitos e formação de rosetas.³

As manifestações clínicas têm amplo espectro, havendo pacientes assintomáticos que cursam apenas com alterações laboratoriais, pacientes com quadro clínico semelhante à hepatite aguda viral e até o quadro grave de insuficiência hepática (aguda, crônica ou fulminante).^{2,3,4} Alguns casos cursam ainda com associação à colangite autoimune (CAI), sendo que nesta situação o acometimento hepático ocorre em hepatócitos e também em ductos biliares.² Essa associação é relatada na literatura numa frequência de 2 a 8% entre os pacientes adultos com hepatite autoimune.⁶ Não se sabe ainda ao certo se ela é uma manifestação atípica da mesma doença ou uma entidade única, diferente da HAI e do seu principal diagnóstico diferencial descrito a seguir.⁶

Apesar da patogênese da doença não ser completamente conhecida, sabe-se que a susceptibilidade é em parte determinada pela presença de genes relacionados ao complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II), de forma mais direta ao antígeno leucocitário humano (HLA).⁷ Uma associação primária foi descrita com HLA-DR3 e HLA-DR4 em europeus e norte-americanos.⁸ Por outro lado, em crianças foi demonstrado que o HLA-DRB1*1301 é o que mais se relaciona à susceptibilidade à HAI.^{7,9} Acredita-se também que esses achados possam se relacionar com a resposta ao

tratamento e prognóstico, no entanto são poucos os estudos em adultos que avaliaram tal associação.⁷

O mecanismo fisiopatológico da doença envolve ativação de linfócitos, principalmente auxiliares, mas também linfócitos B, macrófagos e células *natural killers* (NK), no entanto não é conhecido o fator (ou fatores) que levam a uma desregulação do sistema imune, criando um ambiente de agressão às células hepáticas.^{10,11} Alterações na expressão de alguns *clusters of differentiation* (CD) em células imunológicas podem ser sinais dessa desregulação.¹²⁻¹⁶ Ainda são necessários mais estudos, como o presente, para avaliar se essas alterações podem estar relacionadas com a doença.

Uma característica importante da HAI é a pronta resposta ao tratamento com corticoesteróides e imunossupressores.² Prednisona isolada ou associada à azatioprina é a principal forma de tratamento utilizada, tendo como objetivos a redução do processo inflamatório hepático, a indução de remissão clínica, a melhora dos sintomas e o aumento da sobrevida.³ A resposta caracteriza-se pela melhora clínica e redução das aminotransferases até valores normais ou, no máximo, duas vezes o maior valor de referência.

A remissão é definida como melhora clínica, normalização das aminotransferases e gamaglobulina, autoanticorpos negativos ou em títulos muito baixos e resolução histológica da inflamação, sendo essa última a mais tardia. Por outro lado, a recaída é caracterizada pelo aumento das transaminases após a remissão ter sido atingida.^{17,18} A recaída durante o tratamento é comum, podendo ocorrer em até 40% dos pacientes e requerendo um aumento temporário da dose de corticóide.³ A não aderência ao tratamento tem papel importante nessa porcentagem de recaídas. O transplante hepático é a última linha de tratamento, sendo indicado aos pacientes que não responderam à medicação. Necessidade de transplante foi relatada em 8,5% das crianças com HAI.¹⁹ O prognóstico dos pacientes que respondem ao tratamento imunossupressor é bom, mesmo quando já existe cirrose na avaliação inicial, com boa qualidade de vida e, em geral, com uso de baixas doses da medicação.^{2,3}

A colangite esclerosante primária (CEP), doença hepática crônica de etiologia desconhecida, mas com componente autoimune, é um dos mais importantes diagnósticos diferenciais da hepatite autoimune.^{20,21} A CEP é caracterizada por inflamação crônica e fibrose de ductos biliares intra e/ou extra hepáticos, com evolução lenta, mas progressiva para cirrose.²⁰ Predomina no gênero masculino e a apresentação

clínica é muito variável, o início da doença é normalmente insidioso e silencioso e muitas crianças apresentam curso prolongado da doença, sendo sua incidência subestimada nesta faixa etária.²⁰

O diagnóstico muitas vezes é feito quando ocorrem as complicações do quadro de cirrose como hemorragia digestiva alta por varizes, ascite, entre outros.²¹ Para certeza, este diagnóstico é baseado em achados colangiográficos típicos (dilatações e estreitamentos multifocais em parte ou em toda a árvore biliar), achados clínicos, laboratoriais e histológicos, além da exclusão de causas secundárias de colangite.^{22,23} Laboratorialmente, pode se assemelhar muito à HAI, podendo ocorrer aumento de gamaglobulina sérica, presença de anticorpos antimúsculo liso, FAN (Fator Antinuclear), ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) e ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae antibodies*).^{20,22}

A patogênese da CEP ainda não é totalmente compreendida, mas acredita-se numa interação complexa entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Estudos têm mostrado uma forte predisposição genética, com parentes de primeiro grau exibindo nove a 39 vezes maior risco de desenvolver a doença.²⁴ Esta tendência genética parece estar associada principalmente com o antígeno leucocitário humano (HLA) no complexo II (MHC II) encontrado no cromossomo 6p21, assim como na HAI.^{25,26} Alguns subtipos do HLA são considerados como principais fatores de susceptibilidade, sendo que o HLA-DRB1 tem grande importância. HLA-DRB1*0301, -DRB1*1301 e -DRB1*1501 são descritos como predisponentes à doença, enquanto -DRB1*0401 e -DRB1*0701 são vistos como protetores.²⁵⁻²⁹

Assim como na HAI, o mecanismo fisiopatológico da doença envolve ativação de linfócitos, principalmente auxiliares, mas também linfócitos B, macrófagos e células *natural killers* (NK), no entanto não é conhecido o fator (ou fatores) que levam a uma desregulação do sistema imune, criando um ambiente de agressão às células biliares hepáticas.^{30,31} Alterações na expressão de alguns *clusters of differentiation* (CD) em células imunológicas, associadas a liberação de citocinas, também estão envolvidos nessa desregulação.³⁰⁻³²

O tratamento, diferentemente da HAI, é feito com a utilização do ácido ursodesoxicólico (UDCA), que não impede a evolução da doença para cirrose. O transplante hepático pode ser necessário com a evolução da doença.²⁰

REFERÊNCIAS

- 1- Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, Hadchouel P, Alagille D. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 376-381.
- 2- Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, González-Peralta P, Kelly D, Mohan N, Shah U, Murray KF. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, 49:158-164.
- 3- Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children: What is different from adult AIH? *Semin Liver Dis* 2009; 29:297-306.
- 4- Squires RH. Autoimmune hepatitis in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6:225-230.
- 5- Bogdanos DP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2009; 29:241-253.
- 6- Dienes HP, Erberich H, Dries V, Schirmacher P, Lohse A. Autoimmune hepatitis and overlap syndromes. *Clin Liver Dis* 2002; 6(2):349-62.
- 7- Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, Badia I, Daruich J, Findor J, Tanno H, Cañero-Velasco C, Fainboim L. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: Evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999; 30:1374-1380.
- 8- Donaldson PT, Doherty Dg, Hayllar KM, McFarlane IG, Johnson PJ, Williams R. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens HLA-DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* 1991; 13:701-706.
- 9- Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cançado ELR, Porta G, Goldberg AC, Donaldson PT. Clinical distinctions and pathogenic implications of type I autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002; 37:302-308.
- 10- Liu PMF, Miranda DM, Fagundes EDT, Ferreira AR, Silva ACS. Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors. *World J Gastroenterol* 2013; 19(28): 4455-4463.

- 11- Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176: 4484-4491.
- 12- Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67.
- 13- Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, Hussain MJ, Ma Y, Lenzi M, Mieli-Vergani G, Bianchi FB, Vergani D, Muratori L. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 52: 999-1007.
- 14- Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, Yoneyama H, Kimura Y, Watanabe S, Kuriyama S. Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2523-2529.
- 15- Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-345.
- 16- Ogawa S, Sakaguchi K, Takaki A, Shiraga K, Sawayama T, Mouri H, Miyashita M, Koide N, Tsuji T. Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 69-75.
- 17- Ferreira AR, Roquete ML, Toppa NH, de Castro LP, Fagundes ED, Penna FJ. Effect of treatment of hepatic histopathology in children and adolescents with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46(10):65-70.
- 18- Ferreira AR, Roquete MLV, Penna FJ, Toppa NH, Castro LPF. Hepatite auto-imune tipo 1 em crianças e adolescentes: avaliação da suspensão do tratamento imunossupressor. *Jornal de Pediatria* 2005, 81: 343-348.
- 19- Gregorio GV, Portmann B, Reid F, ET AL. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997; 25(3):541-547.
- 20- Mieli-Vergani G, Vergani D. Unique features of primary sclerosing cholangitis in children. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 265-8.
- 21- Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis and PSC connection. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 187-202.

- 22- Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney DM, Boberg KM, Shneider B, Gores GJ. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010; 51:660-678.
- 23- Dave M, Elmunzer BJ, Dwamena BA, Higgins PD. Primary sclerosing cholangitis: Meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2010; 256:387-96.
- 24- Bergquist A, Lindberg G, Saarinen S, Broomé U. Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives. *J Hepatol* 2005; 42:252–256.
- 25- Karlsen TH, Franke A, Melum E, Kaser A, Hov JR, Balschun T, Lie BA, Berquist A, Schramm C, Weismüller TJ, Gotthardt D, Rust C, Phillipp EE, Fritz T, Henckaerts L, Weersma RK, Stokkers P, Ponsioen CY, Wijmenga C, Sterneck M, Nothnagel M, Hampe J, Teufel A, Runz H, Rosenstiel P, Stiehl A, Vermeire S, Beuers U, Manns MP, Schrumpf E, Boberg KM, Schreiber S. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2010; 138:1102–1111.
- 26- Melum E, Franke A, Schramm C, Weismüller TJ, Gotthardt DN, Offner FA, Juran BD, Laerdahl JK, Labi V, Björnsson E, Weersma RK, Henckaerts L, Teufel A, Rust C, Ellinghaus E, Balschun T, Boberg KM, Ellinghaus D, Bergquist A, Sauer P, Ryu E, Hov JR, Wedemeyer J, Lindkvist B, Wittig M, Porte RJ, Holm K, Gieger C, Wichmann HE, Stokkers P, Ponsioen CY, Runz H, Stiehl A, Wijmenga C, Sterneck M, Vermeire S, Beuers U, Villunger A, Schrumpf E, Lazaridis KN, Manns MP, Schreiber S, Karlsen TH. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nat Genet* 2011; 43:17–19.
- 27- Folseraas T, Melum E, Rausch P, Juran BD, Ellinghaus E, Shiryaev A, Laerdahl JK, Ellinghaus D, Schramm C, Weismüller TJ, Gotthardt DN, Hov JR, Clausen OP, Weersma RK, Janse M, Boberg KM, Björnsson E, Marschall HU, Cleynen I, Rosenstiel P, Holm K, Teufel A, Rust C, Gieger C, Wichmann HE, Bergquist A, Ryu E, Ponsioen CY, Runz H, Sterneck M, Vermeire S, Beuers U, Wijmenga C, Schrumpf E, Manns MP, Lazaridis KN, Schreiber S, Baines JF, Franke A, Karlsen TH. Extended analysis of a genome-wide association study in primary sclerosing cholangitis detects multiple novel risk loci. *J Hepatol* 2012; 57:366–375.
- 28- Spurkland A, Saarinen S, Boberg KM, Mitchell S, Broome U, Caballeria L, Ciusani E, Chapman R, Ercilla G, Fausa O, Knutsen I, Pares A, Rosina F, Olerup O, Thorsby E,

Schrumpf E. HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations. *Tissue Antigens* 1999; 53:459–469.

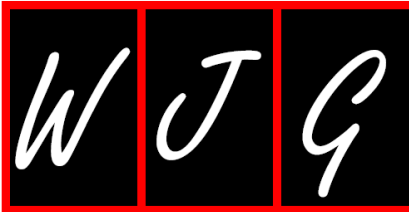
29- Donaldson PT, Norris S. Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity* 2002; 35(8):555–564.

30- Liaskou E, Hirschfield GM, Gershwin ME. Mechanisms of tissue injury in autoimmune liver diseases. *Semin Immunopathol* 2014; 36:553-568.

31- Whiteside TL, Lasky S, Si L, Van Thiel DH. Immunologic analysis of mononuclear cells in liver tissues and blood of patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1985; 5:468-474.

32- Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, Panasiuk B, Wysocka J. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood in primary sclerosing cholangitis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1289–1291.

2.1 - Artigo de revisão 1



World Journal of
Gastroenterology

Online Submissions: <http://www.wjgnet.com/esps/wjg@wjgnet.com>
doi:10.3748/wjg.v19.i28.4455

World J Gastroenterol 2013 July 28; 19(28): 4455-4463
ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)
© 2013 Baishideng. All rights reserved.

REVIEW

Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors

Priscila Menezes Ferri Liu, Débora Marques de Miranda, Eleonora Druve Tavares Fagundes, Alexandre Rodrigues Ferreira, Ana Cristina Simões e Silva

Priscila Menezes Ferri Liu, Débora Marques de Miranda, Eleonora Druve Tavares Fagundes, Alexandre Rodrigues Ferreira, Ana Cristina Simões e Silva, Department of Pediatrics, Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil

Débora Marques de Miranda, Ana Cristina Simões e Silva, National Institute of Science and Technology of Molecular Medicine, (INCT-MM) CNPq-FAPEMIG, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil

Author contributions: Miranda DM, Fagundes EDT and Ferreira AR designed the research; Ferri Liu PM performed the research; Ferri Liu PM, Miranda DM, Ferreira AR and Simoes e Silva AC wrote the paper; all authors reviewed final version.

Supported by CAPES, INCT-MM (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573646/2008-2)

Correspondence to: Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD, Department of Pediatrics, Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigations, Federal University of Minas Gerais, Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, Room 281, Belo Horizonte, Minas Gerais 30130-100, Brazil. acssilva@hotmail.com

Telephone: +55-31-34098073 Fax: +55-31-34099772

Received: April 7, 2013 Revised: June 5, 2013

Accepted: June 8, 2013

Published online: July 28, 2013

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a rare chronic inflammatory disease of the liver, which affects a group of patients who lost their immunological tolerance to antigens of the liver. It is clinically characterized by hypergammaglobulinemia, elevated liver enzymes, presence of autoantibodies and histological changes. Although being rare in children, it represents a serious cause of chronic hepatic disease that can lead to cirrhosis and hepatic failure. Clinical findings, exclusion of more common liver disorders and the detection of antibodies antinuclear antibodies, smooth muscle antibodies and anti-LKM1 are usually enough for diagnosis on clinical

practice. The pathogenic mechanisms that lead to AIH remain obscure, but some research findings suggest the participation of immunologic and genetic factors. It is not yet known the triggering factor or factors that stimulate inflammatory response. Several mechanisms proposed partially explain the immunologic findings of AIH. The knowledge of immune factors evolved might result in better markers of prognosis and response to treatment. In this review, we aim to evaluate the findings of research about genetic and immune markers and their perspectives of application in clinical practice especially in pediatric population.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key words: Autoimmune hepatitis; Genetics; Clinical practice; Immunophenotype

Core tip: In this review article, we reported recent data on autoimmune hepatitis in pediatric patients highlighting the importance of genetic and immune markers. We also discuss the perspectives of the application of these new biomarkers in clinical practice.

Ferri Liu PM, Miranda DM, Fagundes EDT, Ferreira AR, Simoes e Silva AC. Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors. *World J Gastroenterol* 2013; 19(28): 4455-4463 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i28/4455.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v19.i28.4455>

INTRODUCTION

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disease of the liver that is rarely found in children and adolescents. AIH affects a group of patients who have lost their immunological tolerance to antigens of

the liver^[1-4]. It is more frequent in female patients and is characterized by hypergammaglobulinemia, elevated liver enzymes, the presence of autoantibodies and histological changes^[4-7]. The age of onset usually ranges from months to 75 years old, but it is very rare before the age of two years old, and the highest incidence occurs between 10 and 30 years old^[2]. In addition to being considered rare in children, AIH represents a serious cause of chronic hepatic disease, which can result in cirrhosis and its complications. Immunosuppressive treatment results in a good response, but a delay in or absence of treatment can result in cirrhosis and liver failure^[2,6]. This condition can also be complicated by association with autoimmune cholangitis, in which bile duct disease is present together with hepatitis, particularly in children^[2,7,8].

Clinical and laboratory diagnosis

Because histological activity index (HAI) is a rare disorder, one crucial point for diagnosis is the exclusion of more common pathologies. The diagnosis is confirmed by clinical findings, laboratory and histopathology tests and the exclusion of other causes of chronic liver disease^[4,6,7,9]. The clinical spectrum is broad, ranging from asymptomatic laboratory abnormalities to clinical symptoms similar to fulminant acute viral hepatitis. The classical presentation is jaundice, dark urine, fever, asthenia, anorexia and increased abdominal volume in an acute or insidious presentation^[6,10]. Hepatomegaly, splenomegaly and signs of chronic liver disease, such as spider veins, collateral circulation and abdominal ascites, might be present. Approximately 20% of cases are associated with other autoimmune disorders^[8].

According to the presence of autoantibodies, AIH can be classified into two forms: type 1 autoimmune hepatitis, in which antinuclear antibodies (ANAs) and/or anti-smooth muscle antibodies (SMAs) are detected; and autoimmune hepatitis type 2, in which anti-liver-kidney (anti-LKM1) autoantibodies are detected^[9,11-13]. In adult patients, the presence of anti-soluble liver-kidney antigen and anti-liver-pancreas might be understood as a third form of AIH (AIH type 3), despite clinical features similar to type 1^[14]. Type 1 is the most common type of AIH in any age group, while type 2 usually occurs in younger patients, with courses having a greater likelihood of acute liver failure^[2,3].

During treatment, ANA and SMA levels can decrease, but neither level seems to have a correlation with prognosis^[15-17]. Therefore, 10%-15% patients are negative for ANAs, SMAs and LKM-1 at clinical presentation but later show detectable levels of these autoantibodies, with only five percent remaining negative over time^[15,18]. Other autoantibodies could facilitate in diagnosis and/or act as prognostic markers, and their possible clinical applications are listed in Table 1^[19-38].

Most services do not perform routine assessment of the autoantibodies shown in Table 1, which remain reserved for research situations. The antibodies ANA,

SMA and anti-LKM1 are usually sufficient for diagnosis in clinical practice. More research is needed to establish the clinical use of these autoantibodies and to investigate the presence of these autoantibodies in pediatric patients, thereby elucidating their role in this group of patients.

Diagnostic criteria

The International Autoimmune Hepatitis Group diagnostic criteria for AIH, published in 1993 and revised in 1999, guide diagnosis and facilitate early treatment^[39-41]. A simplified scoring system, created in 2008, considers transaminases levels, autoantibodies, immunoglobulin G levels, liver biopsy, exclusion of Wilson disease and of viral hepatitis and cholangiogram^[41,42]. The use of these criteria could also be helpful in children, but limitations must be recognized^[43]. In children, it is difficult to differentiate AIH from primary sclerosing cholangitis or to identify autoimmune cholangitis overlap syndrome. The diagnosis of fulminant hepatitis cases has not been well determined because the use of 1/40 as a titer for autoantibodies is high to use in children (1/20 for ANA and SMA and 1/10 for anti-LKM1 are considered positive in this age group)^[3,43]. For these reasons, histology is often included in the diagnostic criteria for HAI in children^[3,44]. On histological examination, characteristic findings include the presence of piecemeal necrosis (interface hepatitis), lymphoplasmocytic infiltrates with numerous plasmacytes, and rosette formation^[44,45]. Histology is a powerful tool for diagnosis, with high specificity (81%-99%) and predictability (62%-91%) but low sensitivity (36%-57%)^[45]. Some cases also demonstrate biliary duct alterations, such as inflammatory infiltration of duct cells, cholestasis and ductopenia, which might represent an overlapping syndrome^[46].

Genetic and immunologic markers

Some studies have unveiled the association of AIH with genetic markers, and the impact of immunophenotyping on clinical practice has been described.

Although the pathogenesis of AIH is not fully understood, susceptibility is partly determined by the presence of genes related to major histocompatibility complex II (MHC II) and most directly to human leukocyte antigen (HLA)^[7,47]. The main associations are with HLA-DR3 and HLA-DR4 (DRB1*03 and DRB1*04) in Europeans and North Americans^[48]. In children, HLA-DRB1*1301 is related to susceptibility to HAI, determining the prognosis and response to treatment^[47,49]. The findings of the immunophenotyping in HAI are shown in Table 2.

Some conclusions can be drawn from these studies, in addition to some controversial findings^[48-57]. Fortes Mdel *et al*^[50] showed that patients presenting the HLA-DRB1*1301 allele were associated with a higher likelihood of developing cirrhosis. Czaja *et al*^[56] concluded that patients with -DRB1*03 were younger at disease onset than patients with -DRB1*04, and they also had worse responses to corticotherapy. Patients expressing HLA

Table 1 Autoantibodies studies and their findings

Type of AIH	Autoantibodies	Antigen	Meaning
AIH type 1	Anti-actin	Actin	Poor response to treatment with corticosteroids ^[19-21]
AIH types 1 and 2 (80%-90% of cases)	Anti-asialoglycoprotein receptor	Asialoglycoprotein receptor	Liver specific antigen and indicative of prognosis ^[22,23]
AIH types 1 and 2 (8%-20% of cases)	Antimitochondrial antibody-M2	Mitochondria	Favorable response to corticosteroids ^[24,25]
AIH type 1 (39% of cases)	Anti-chromatin	Chromatin	High titers of immunoglobulin G and shows disease activity ^[26,27]
AIH type 2 (32% of cases)	Anti-liver-cytosol type 1	Enzyme formiminotransferase cyclodeaminase	Diagnostic tool and marker of liver inflammation ^[28-30]
AIH type 1	Antibody to histone and dsDNA	dsDNA	High titers of immunoglobulin G and poor-immediate response to corticosteroids ^[29]
AIH type 1 (47.5% of cases)	Anti-soluble liver antigen	t-RNAs	Presence of severe forms, associated with fatal outcome ^[31-35]
AIH type 2 (5%-19% of cases)	LKM-3	Uridinediphosphateglucuronyl transferase	Allows diagnosis, being sometimes the only marker identified ^[36]
AIH type 1	Perinuclear antinuclear neutrophil cytoplasmic antibodies	Peripheral nuclear and perinuclear antigen	Presence of severe forms; Most frequent in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis ^[36-38]

AIH: Autoimmune hepatitis; dsDNA: Double-stranded DNA.

DRB1*04 are more often women, with a greater risk of comorbidity with other immune diseases and with good responses to corticosteroids^[56,58].

In contrast, MHC II antigens have shown significant heterogeneity among different ethnicities. Patients with HLA-DRB1*13 and -DRB1*03 have an earlier onset of disease compared to other patients, possibly because their ethnic groups that have a tendency toward AIH onset at younger ages. Moreover, certain ethnic groups have low prevalences of these immunophenotypes, such as the populations of Mexico and Japan, where HLA-DRB1*04 is more common, and these low rates seem to establish increased susceptibility to the disease in older people^[50-52]. Few studies have demonstrated the role of immunophenotypes in HAI in children; to apply these markers as indicators of response to treatment and prognosis, more studies are needed.

The known physiopathological mechanism in AIH consists of an inflammatory response with T-lymphocyte cells, principally helpers, and B lymphocytes, macrophages and natural killer cells. The triggering factor or factors that stimulate this inflammatory response are not yet known. Several mechanisms have been proposed that would partially explain the immunologic findings of AIH^[7,59].

Studies in adults and children have identified some potential pathways for the damage observed in AIH, such as the deregulation of immunoregulatory mechanisms. Some of the studies have shown that AIH patients have reductions in the number and function of T lymphocytes CD4⁺CD25⁺, which is one of the regulatory cells (T-regs) that normally represent 5%-10% of CD4 T cells in healthy humans^[7,59-66]. These cells suppress the proliferation and cytokine responses of effectors CD4 and CD8 T cells, and they down-regulate the functions of macrophages, dendritic cells, natural killer cells, and B lymphocytes^[62].

All immune findings are more pronounced in the initial

presentation than after remission with treatment^[61,62,66,67]. T-reg immunosuppressive functioning causes the production of anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor (TGF)-beta^[68,69]. The surface markers involved in anti-inflammatory mechanisms are glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (CD62L), cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) and fork head/winged helix transcription factor (FOXP3)^[62,70]. If the mechanisms of failure become known, new treatments, based on recuperation of the function of T-regulation, could be used in AIH^[70-72].

Natural killer T cells (CD3⁺ and CD56⁺) are found in reduced numbers, producing lower levels IL-4 and IL-2 in AIH patients. These lower levels result in reduction of the surface expression of CTLA-4 in CD4⁺T cells, playing a pivotal role in liver autoaggression, especially during the active phase of the disease^[61,72]. Kurokohchi *et al.*^[73] also found that the levels of CTLA-4 were reduced in inflammatory cells from the peripheral blood of AIH patients, compared with controls, while levels of CD80⁺ and CD86⁺ were increased in liver-infiltrating cells. Other research has shown that the CCR5 cytokine receptor was preferentially expressed on Th1 cells. This cytokine plays a pivotal role in the recruitment of interferon-gamma (IFN-γ) (a pro-inflammatory cytokine), producing CD4⁺ T cells at inflammatory sites, such as hepatic tissue, and promoting hepatocyte damage in AIH^[73,74]. Another possibility involves the presence of CD4 and/or CD8 self-reactive T cells, which could damage liver cells. These cells are found in healthy people, but in AIH patients, they are 10-fold higher in number^[68,75].

Studies have also suggested that mutations in these genes act as precursors of the surface markers of immune cells and might also have significance in autoimmune diseases because changes in HLA (MHC) are absent in some patients. Mutations of several lympho-

Table 2 Major histocompatibility complex class II human leukocyte antigen and its association with autoimmune hepatitis patients

Ref.	Total No. of patients/ controls (No. of children)	What was evaluated	Conclusions
Donaldson <i>et al</i> ^[48]	96/100 (no)	HLA-DR	HLA-DR3 and DR4 genes independently confer susceptibility to autoimmune hepatitis
Fortes Mdel <i>et al</i> ^[50]	41/111 (13)	HLA-A, -B, -C, -DR and DQ	Regarding HLA-A and -C there were no significant differences between groups; For HLA class I, an increase in the frequency of B*08, B*18, B*45 and B*50 was observed. HLA B*40 was more frequent in healthy controls; For HLA class II, an increase in the frequency of HLA-DQB1*02, -DQB1*04, HLA-DRB1*03, DRB1*13 and DRB3 was observed. HLA-DRB1*1301 and -DRB1*0301 were more frequent in children
Ota <i>et al</i> ^[51]	51/no (no)	HLA-DR and -DQ	Increased frequency of all HLA-DRB1*04 alleles, principally -DRB1*0405. Secondary association with -DRB1*15 and DRB1*16
Vázquez-García <i>et al</i> ^[52]	30/175 (not cited)	HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ	A significant association with HLA-DRB1*0404 was found. It was present in patients with average age onset. DQB1*0301 had a low frequency in patients and may represent a protective factor; No association was found with any class I antigen
Fainboim <i>et al</i> ^[53]	52/197 (all)	HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ	No significant associations with HLA class I antigens were found; HLA-DR6 group (HLA-DRB1) showed increased frequency, principally HLA-DRB1*1301;
Pando <i>et al</i> ^[54]	206/208 (122)	HLA-DR and -DQ	The analyses of HLA-DQ group showed an associations of HLA-DQB1*0603 The frequencies of HLA-DRB1*1301, -DRB1*0301, -DQA1*0103, -DQB1*0603 were significantly increased on AIH patients; HLA-DRB1*1301 was associated with younger age at disease onset, being the allele associated with AIH in children and HLA-DRB1*1302 worked as a protective factor
Bittencourt <i>et al</i> ^[55]	139/129 (74)	HLA-DRB and -DQB1	In AIH type 1, there was significant increase in the HLA-DRB1*13, -DRB1*03, -DRB3 and -DQB1*06 alleles in patients. HLA-DRB1*13 was more frequent in children than adults. The low frequency of HLA-DQB1*0301 may indicate a protective role of this allele; In AIH type 2, a significant increase in DRB1*07, DRB1*03, DRB4 and DQB1*02 was observed
Czaja <i>et al</i> ^[56]	86/102 (not cited)	HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ	DRB4*0103 is associated with immune diseases, DRB1*0301 with a poor treatment response, and DRB1*0401 with a lower frequency of hepatic death or transplantation
Czaja <i>et al</i> ^[57]	210/396 controls with other chronic liver disease/102 healthy controls (no)	HLA-DR B1*03, -DRB1*04 and -DRB1*13	The frequency of HLA DRB1*13 was higher in patients without -DRB1*03 and -DRB1*04; Primary sclerosing cholangite patients showed a similar frequency of HLA-DRB1*13 when compared with AIH patients

HLA: Human leukocyte antigen; MHC: Major histocompatibility complex; AIH: Autoimmune hepatitis.

cyte surface markers studied could represent molecular markers of autoimmunity in AIH. Among them is the CTLA-4 (CD152) gene mutation, which has appeared in controversial reports of the phenotypes that represent susceptibility to AIH^[76-81]. For instance, in the Brazilian study by Bittencourt *et al*^[77] no association was established between exon 1 *CTLA-4* gene polymorphisms at position 49 and AIH susceptibility, contradicting findings in a North American population^[78].

CTLA-4, which is expressed on the surface of T cells, induces peripheral tolerance by binding CD80 and CD86 on antigen-presenting cells. In doing so, CTLA-4 competes with the co-stimulatory molecule CD28, reducing the immune response^[47]. CTLA-4 is considered a critical coordinator in immune regulation. Based on this finding, some researchers have attempted to find a drug that simulates its mechanism and that could be used in the treatment of autoimmune conditions; one such drug is an immunoglobulin G-CTLA-4 (Abatacept), which was recently approved by the FDA for use in rheumatoid arthritis^[82,83].

Furthermore, some studies have aimed to evalu-

ate whether a *Fas* gene polymorphism or its increased expression on lymphocyte surfaces could be key mechanisms for autoimmunity in AIH. *Fas* (CD95) is part of the tumor necrosis factor family, and it induces receptor-mediated programmed cell death (apoptosis) through engagement with its ligand (*FasL*/CD95L). It indirectly controls the number of antigen-activated lymphocytes^[84]. Ogawa *et al*^[85] showed that AIH patients show an increase in CD95 (*Fas*)-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cell numbers. These individuals show disease courses with high levels of conversion of naive CD45RO⁻ to primed CD45RO⁺ CD4⁺ T cells. This course could indicate that constant activation of T lymphocytes and/or the persistent presence of activated lymphocytes requires continuous work from regulation cells, such as CD95⁺ T CD4⁺^[85]. Tsikrikoni *et al*^[86] also found a greater number of Fas⁺ and FasL⁺ cells in the mononuclear cells of AIH patients and increased TNF- α and IFN- γ production in cultured cells, suggesting that these cytokines could be involved in accelerating apoptosis. They also showed an increase in CD14⁺ monocyte cell numbers, in accordance with the increased

expression of apoptotic markers, such as CD14⁺ cells, responding to the clearance of apoptotic cells^[87]. Concomitantly, the results of genetic studies have shown that some mutations can affect the function of Fas receptors, but more research is needed to determine these receptors' relationship with AIH^[88-91].

A lack of consistent evidence has persisted for studies evolving genes of cytokines, such as tumor necrosis factor; TGF-beta1, and TBX21, (a regulator of T lymphocyte lineage development and a controller of the expression of IFN- γ)^[91-98].

TREATMENT

An important feature of AIH is response to treatment with corticosteroids and immunosuppressants^[2,6,99]. Prednisone alone or in combination with azathioprine is the main form of treatment^[99]. This treatment has the goal of reducing hepatic inflammation, the induction of clinical remission, relief of symptoms and improvement of survival. The treatment response characterizes clinical improvement and a reduction of aminotransferases to normal or to no more than two times of the maximum of the reference value, while remission lies in clinical improvement, normalization of aminotransferases and gamma globulin, autoantibody reduction or extremely low titers of autoantibodies and histological resolution of inflammation with a reduction in fibrosis^[3,44]. Moreover, relapse is characterized by increased transaminases after remission has been achieved, as shown by Ferreira *et al*^[44,100]. Relapse is common during treatment and occurs in up to 40% of patients, requiring a temporary increase in the dose of corticosteroid^[3,99]. Noncompliance play a prominent role in a percentage of relapses^[44,100]. Some medications offer alternative treatment, such as cyclosporine, tacrolimus and mycophenolate mofetil. These drugs are reserved for patients who fail to respond to the first treatment choice^[2,6]. In cases of autoimmune sclerosing cholangitis and autoimmune cholangitis, the use of ursodeoxycholic acid can be necessary to control bile duct disease^[2].

Liver transplantation is the last-line treatment indicated for patients who have not responded to medication. The need for transplantation is present in 8.5% of children with HAI^[8]. The total duration of immunosuppressive therapy has not been established, but in the face of the possible side effects with medication, discontinuation of treatment should be considered when the remission criteria are met in patients with type 1 AIH^[3]. To meet this goal, the patient must present histological resolution of inflammation after at least two years of clinical and laboratory remission (normal liver enzymes, liver function and gamma globulin and autoantibodies in low or undetectable titers)^[3]. Approximately 20% of patients with type 1 AIH can remain in remission after discontinuation of treatment, but relapses are frequent after the suspension of treatment^[6,8,100]. In type 2 AIH, treatment discontinuation is not recommended because relapses are

more frequent, and failure of remission upon suspension is almost certain in this condition^[8].

The prognosis of patients who respond to immunosuppressive treatment is good, even when there is cirrhosis at baseline; there is a good quality of life and, in general, use of low doses of medication^[2-4]. Except for the changed autoantibodies that were initially detected, no markers are currently used in clinical practice to choose and follow treatment.

CONCLUSION

In conclusion, recent studies have shown new possibilities for the diagnosis and prognostic evaluation of AIH, except for in the pediatric age group, which remains unrepresented in these assessments. Susceptibility to autoimmune diseases is multifactorial, but genetic and immunological factors play pivotal roles. MHC II antigens could represent a susceptibility marker for AIH, considering the differences between ethnic groups, or they might predict treatment response and prognosis. Finally, in pediatric populations, the prevalence and titers of autoantibodies can be different from in adults, such as for the MHC II HLA-DRB1*1301, which can be a marker of susceptibility in the pediatric population.

Perhaps in the future, knowledge of autoimmune mechanisms will reveal better markers for the diagnosis, monitoring and treatment of AIH and other autoimmune diseases, but there are still only few available studies with good suggestions for markers.

REFERENCES

- 1 Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, Hadchouel P, Alagille D. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; **17**: 376-381 [PMID: 8145091 DOI: 10.1097/00005176-199311000-00007]
- 2 Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, González-Peralta RP, Kelly D, Mohan N, Shah U, Murray KF. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; **49**: 158-164 [PMID: 19561543 DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181a1c265]
- 3 Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children: what is different from adult AIH? *Semin Liver Dis* 2009; **29**: 297-306 [PMID: 19676002 DOI: 10.1055/s-0029-1233529]
- 4 Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; **354**: 54-66 [PMID: 16394302 DOI: 10.1056/NEJMra050408]
- 5 Squires RH. Autoimmune hepatitis in children. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; **6**: 225-230 [PMID: 15128490 DOI: 10.1007/s11894-004-0012-7]
- 6 Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; **36**: 479-497 [PMID: 12143059 DOI: 10.1053/jhep.2002.34944]
- 7 Oo YH, Hubscher SG, Adams DH. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol Int* 2010; **4**: 475-493 [PMID: 20827405 DOI: 10.1007/s12072-010-9183-5]
- 8 Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001; **33**: 544-553 [PMID: 11230733 DOI: 10.1053/jhep.2001.22131]

- 9 **Bogdanos DP**, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2009; **29**: 241-253 [PMID: 19675997 DOI: 10.1055/s-0029-1233533]
- 10 **Fallatah HI**, Akbar HO, Qari YA. Autoimmune hepatitis: Single-center experience of clinical presentation, response to treatment and prognosis in Saudi Arabia. *Saudi J Gastroenterol* 2010; **16**: 95-99 [PMID: 20339178 DOI: 10.4103/1319-3767.61235]
- 11 **Homborg JC**, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, Poupon R, Darnis F, Lévy VG, Gripon P. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987; **7**: 1333-1339 [PMID: 3679093 DOI: 10.1002/hep.1840070626]
- 12 **Muratori P**, Muratori L, Agostinelli D, Pappas G, Veronesi L, Granito A, Cassani F, Terlizzi P, Lenzi M, Bianchi FB. Smooth muscle antibodies and type 1 autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002; **35**: 497-500 [PMID: 12765475 DOI: 10.1080/0891693021000054066]
- 13 **Villalta D**, Bizzaro N, Da Re M, Tozzoli R, Komorowski L, Tonutti E. Diagnostic accuracy of four different immunological methods for the detection of anti-F-actin autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis and other liver-related disorders. *Autoimmunity* 2008; **41**: 105-110 [PMID: 18176872 DOI: 10.1080/08916930701619896]
- 14 **Czaja AJ**, Kruger M, Santrach PJ, Moore SB, Manns MP. Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997; **92**: 2197-2200 [PMID: 9399751]
- 15 **Fallatah HI**, Akbar HO. Autoimmune hepatitis as a unique form of an autoimmune liver disease: immunological aspects and clinical overview. *Autoimmune Dis* 2012; **2012**: 312817 [PMID: 23304455 DOI: 10.1155/2012/312817]
- 16 **Czaja AJ**, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; **120**: 239-249 [PMID: 11208733 DOI: 10.1053/gast.2001.20223]
- 17 **Mehendiratta V**, Mitroo P, Bombonati A, Navarro VJ, Rossi S, Rubin R, Herrine SK. Serologic markers do not predict histologic severity or response to treatment in patients with autoimmune hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; **7**: 98-103 [PMID: 18955163 DOI: 10.1016/j.cgh.2008.08.043]
- 18 **Miyake Y**, Iwasaki Y, Kobashi H, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Okamoto R, Takaguchi K, Ikeda H, Makino Y, Ando M, Sakaguchi K, Yamamoto K. Clinical features of antinuclear antibodies-negative type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 2009; **39**: 241-246 [PMID: 19054143 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2008.00454.x]
- 19 **Czaja AJ**, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; **24**: 1068-1073 [PMID: 8903377 DOI: 10.1002/hep.510240515]
- 20 **Renaudineau Y**, Dalekos GN, Guéguen P, Zachou K, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies cross-react with anti-ssDNA antibodies in active autoimmune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; **34**: 321-325 [PMID: 18197482 DOI: 10.1007/s12016-007-8050-1]
- 21 **Zachou K**, Oikonomou K, Renaudineau Y, Chauveau A, Gatselis N, Youinou P, Dalekos GN. Anti- α actinin antibodies as new predictors of response to treatment in autoimmune hepatitis type 1. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 116-125 [PMID: 22050113 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04908.x]
- 22 **McFarlane IG**, Hegarty JE, McSorley CG, McFarlane BM, Williams R. Antibodies to liver-specific protein predict outcome of treatment withdrawal in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1984; **2**: 954-956 [PMID: 6149344 DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91167-X]
- 23 **McFarlane IG**, McFarlane BM, Major GN, Tolley P, Williams R. Identification of the hepatic asialo-glycoprotein receptor (hepatic lectin) as a component of liver specific membrane lipoprotein (LSP). *Clin Exp Immunol* 1984; **55**: 347-354 [PMID: 6199139]
- 24 **Kenny RP**, Czaja AJ, Ludwig J, Dickson ER. Frequency and significance of antimitochondrial antibodies in severe chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci* 1986; **31**: 705-711 [PMID: 3720467 DOI: 10.1007/BF01296447]
- 25 **Czaja AJ**, Carpenter HA, Manns MP. Antibodies to soluble liver antigen, P450IID6, and mitochondrial complexes in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1522-1528 [PMID: 8224657 DOI: 10.1016/0016-5085(93)90160-E]
- 26 **Czaja AJ**, Morshed SA, Parveen S, Nishioka M. Antibodies to single-stranded and double-stranded DNA in antinuclear antibody-positive type 1-autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; **26**: 567-572 [PMID: 9303484 DOI: 10.1002/hep.510260306]
- 27 **Czaja AJ**, Shums Z, Binder WL, Lewis SJ, Nelson VJ, Norman GL. Frequency and significance of antibodies to chromatin in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2003; **48**: 1658-1664 [PMID: 12924665]
- 28 **Lapierre P**, Hajoui O, Homborg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; **116**: 643-649 [PMID: 10029623 DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70186-1]
- 29 **Muratori L**, Sztul E, Muratori P, Gao Y, Ripalti A, Ponti C, Lenzi M, Landini MP, Bianchi FB. Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 2001; **34**: 494-501 [PMID: 11526534 DOI: 10.1053/jhep.2001.27179]
- 30 **Martini E**, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homborg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988; **8**: 1662-1666 [PMID: 3192182 DOI: 10.1002/hep.1840080632]
- 31 **Manns M**, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Büschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987; **1**: 292-294 [PMID: 2880112 DOI: 10.1016/S0140-6736(87)92024-1]
- 32 **Stechemesser E**, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993; **18**: 1-9 [PMID: 8325600 DOI: 10.1002/hep.1840180102]
- 33 **Costa M**, Rodríguez-Sánchez JL, Czaja AJ, Gelpí C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 2000; **121**: 364-374 [PMID: 10931155 DOI: 10.1046/j.1365-2249.2000.01280.x]
- 34 **Czaja AJ**, Donaldson PT, Lohse AW. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 413-419 [PMID: 11866281 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05479.x]
- 35 **Ma Y**, Okamoto M, Thomas MG, Bogdanos DP, Lopes AR, Portmann B, Underhill J, Dürr R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2002; **35**: 658-664 [PMID: 11870381 DOI: 10.1053/jhep.2002.32092]
- 36 **Zachou K**, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 2004; **1**: 2 [PMID: 15679907 DOI: 10.1186/1740-2557-1-2]
- 37 **Rozenendaal C**, de Jong MA, van den Berg AP, van Wijk RT, Limburg PC, Kallenberg CG. Clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 2000; **32**: 734-741 [PMID: 10845659 DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80241-X]
- 38 **Terjung B**, Worman HJ, Herzog V, Sauerbruch T, Spengler U. Differentiation of antineutrophil nuclear antibodies in

- inflammatory bowel and autoimmune liver diseases from antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) using immunofluorescence microscopy. *Clin Exp Immunol* 2001; **126**: 37-46 [PMID: 11678897 DOI: 10.1046/j.1365-2249.2001.01649.x]
- 39 Mileti E, Rosenthal P, Peters MG. Validation and modification of simplified diagnostic criteria for autoimmune hepatitis in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; **10**: 417-421. e1-2 [PMID: 22179022 DOI: 10.1016/j.cgh.2011.11.030]
- 40 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; **31**: 929-938 [PMID: 10580593 DOI: 10.1016/S0168-8278(99)80297-9]
- 41 Czaja AJ. Performance parameters of the diagnostic scoring systems for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; **48**: 1540-1548 [PMID: 18924244 DOI: 10.1002/hep.22513]
- 42 Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; **48**: 169-176 [PMID: 18537184 DOI: 10.1002/hep.22322]
- 43 Ferri PM, Ferreira AR, Miranda DM, Simões E Silva AC. Diagnostic criteria for autoimmune hepatitis in children: a challenge for pediatric hepatologists. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 4470-4473 [PMID: 22969217 DOI: 10.3748/wjg.v18.i33.4470]
- 44 Ferreira AR, Roquete ML, Toppa NH, de Castro LP, Fagundes ED, Penna FJ. Effect of treatment of hepatic histopathology in children and adolescents with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; **46**: 65-70 [PMID: 18162836 DOI: 10.1097/01.mpg.0000304456.84552.13]
- 45 Czaja AJ, Carpenter HA. Sensitivity, specificity, and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1824-1832 [PMID: 8253358]
- 46 Olsson R, Glaumann H, Almer S, Broomé U, Lebrun B, Bergquist A, Björnsson E, Prytz H, Danielsson A, Lindgren S. High prevalence of small duct primary sclerosing cholangitis among patients with overlapping autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *Eur J Intern Med* 2009; **20**: 190-196 [PMID: 19327611 DOI: 10.1016/j.ejim.2008.06.004]
- 47 Tang J, Zhou C, Zhang ZJ, Zheng SS. Association of polymorphisms in non-classic MHC genes with susceptibility to autoimmune hepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; **11**: 125-131 [PMID: 22484578 DOI: 10.1016/S1499-3872(12)60136-2]
- 48 Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM, McFarlane IG, Johnson PJ, Williams R. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* 1991; **13**: 701-706 [PMID: 2010165 DOI: 10.1002/hep.1840130415]
- 49 Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC, Donaldson PT. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002; **37**: 302-308 [PMID: 12175624 DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00182-4]
- 50 Fortes Mdel P, Machado IV, Gil G, Fernández-Mestre M, Dagher L, León RV, Bianco NE, Tassinari P. Genetic contribution of major histocompatibility complex class II region to type 1 autoimmune hepatitis susceptibility in Venezuela. *Liver Int* 2007; **27**: 1409-1416 [PMID: 17927716 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01581.x]
- 51 Ota M, Seki T, Kiyosawa K, Furuta S, Hino K, Kondo T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H. A possible association between basic amino acids of position 13 of DRB1 chains and autoimmune hepatitis. *Immunogenetics* 1992; **36**: 49-55 [PMID: 1350267 DOI: 10.1007/BF00209292]
- 52 Vázquez-García MN, Aláez C, Olivo A, Debaz H, Pérez-Luque E, Bргуete A, Cano S, de la Rosa G, Bautista N, Hernández A, Bandera J, Torres LF, Keršenobich D, Alvarez F, Gorodezky C. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998; **28**: 985-990 [PMID: 9672174 DOI: 10.1016/S0168-8278(98)80347-4]
- 53 Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, Badía I, Remondino G, Ciocca M, Ramonet M. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype. *Hum Immunol* 1994; **41**: 146-150 [PMID: 7860360 DOI: 10.1016/0198-8859(94)90008-6]
- 54 Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, Badía I, Daruich J, Findor J, Tanno H, Cañero-Velasco C, Fainboim L. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999; **30**: 1374-1380 [PMID: 10573514 DOI: 10.1002/hep.510300611]
- 55 Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, Palacios SA, Chiarella JM, Abrantes-Lemos CP, Baggio VL, Laudanna AA, Kalil J. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**: 1906-1913 [PMID: 10406258 DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01229.x]
- 56 Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1502-1507 [PMID: 8224654 DOI: 10.1016/0016-5085(93)90157-8]
- 57 Czaja AJ, Carpenter HA, Moore SB. HLA DRB1*13 as a risk factor for type 1 autoimmune hepatitis in North American patients. *Dig Dis Sci* 2008; **53**: 522-528 [PMID: 17510796 DOI: 10.1007/s10620-007-9859-4]
- 58 Czaja AJ, Donaldson PT. Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 2051-2057 [PMID: 12190176 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05921.x]
- 59 Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007; **149**: 107-113 [PMID: 17320796 DOI: 10.1016/j.trsl.2006.11.010]
- 60 Longhi MS, Ma Y, Mityr RR, Bogdanos DP, Heneghan M, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; **25**: 63-71 [PMID: 16005184 DOI: 10.1016/j.jaut.2005.05.001]
- 61 Longhi MS, Hussain MJ, Mityr RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; **176**: 4484-4491 [PMID: 16547287]
- 62 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; **182**: 58-67 [PMID: 11722623 DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820104.x]
- 63 Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. Human CD4(+)-CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; **98**: 2736-2744 [PMID: 11675346 DOI: 10.1182/blood.V98.9.2736]
- 64 Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; **167**: 1245-1253 [PMID: 11466340]
- 65 Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, Hussain MJ, Ma Y, Lenzi M, Mieli-Vergani G, Bianchi FB, Vergani D, Muratori L. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; **52**: 999-1007 [PMID: 20683931 DOI: 10.1002/hep.23792]

- 66 Vento S, Hegarty JE, Bottazzo G, Macchia E, Williams R, Edleston AL. Antigen specific suppressor cell function in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1984; **1**: 1200-1204 [PMID: 6202994 DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91691-X]
- 67 Invernizzi P, Mackay IR. Autoimmune liver diseases. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 3290-3291 [PMID: 18528925 DOI: 10.3748/wjg.14.3290]
- 68 Shevach EM, Piccirillo CA, Thornton AM, McHugh RS. Control of T cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Novartis Found Symp* 2003; **252**: 24-36; discussion 36-44, 106-114 [PMID: 14609210 DOI: 10.1002/0470871628.ch3]
- 69 Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 3306-3312 [PMID: 18528928 DOI: 10.3748/wjg.14.3306]
- 70 Longhi MS, Meda F, Wang P, Samyn M, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008; **47**: 581-591 [PMID: 18220288 DOI: 10.1002/hep.22071]
- 71 Longhi MS, Liberal R, Holder B, Robson SC, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25+ cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2012; **142**: 1526-1535.e6 [PMID: 22387392 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.041]
- 72 La Cava A, Van Kaer L. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 2006; **27**: 322-327 [PMID: 16735139 DOI: 10.1016/j.it.2006.05.003]
- 73 Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, Yoneyama H, Kimura Y, Watanabe S, Kuriyama S. Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 2523-2529 [PMID: 16688797]
- 74 Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; **391**: 344-345 [PMID: 9450746 DOI: 10.1038/34814]
- 75 Ajebor MN, Hogaboam CM, Le T, Proudfoot AE, Swain MG. CCL3/MIP-1alpha is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4(+) T cells to the liver. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2907-2918 [PMID: 15368307 DOI: 10.1002/eji.200425071]
- 76 Wen L, Ma Y, Bogdanos DP, Wong FS, Demaine A, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pediatric autoimmune liver diseases: the molecular basis of humoral and cellular immunity. *Curr Mol Med* 2001; **1**: 379-389 [PMID: 11899084 DOI: 10.2174/1566524013363672]
- 77 Bittencourt PL, Palácios SA, Cançado EL, Porta G, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, Goldberg AC. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 1616-1620 [PMID: 12873588 DOI: 10.1016/S0002-9270(03)00307-1]
- 78 Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000; **31**: 49-53 [PMID: 10613727 DOI: 10.1002/hep.510310110]
- 79 Umemura T, Ota M, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ichijo T, Tanaka E, Kiyosawa K. Association of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with type 1 autoimmune hepatitis in Japanese. *Hepatol Res* 2008; **38**: 689-695 [PMID: 18371160 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2008.00337.x]
- 80 Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2001; **62**: 1356-1362 [PMID: 11756004 DOI: 10.1016/S0198-8859(01)00344-5]
- 81 Fan LY, Tu XQ, Cheng QB, Zhu Y, Feltens R, Pfeiffer T, Zhong RQ. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms confer susceptibility to primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 3056-3059 [PMID: 15378793]
- 82 Brizzolara R, Montagna P, Soldano S, Cutolo M. Rapid interaction between CTLA4-Ig (abatacept) and synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2013; **40**: 738-740 [PMID: 23637380 DOI: 10.3899/jrheum.120866]
- 83 Scalapino KJ, Daikh DI. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev* 2008; **223**: 143-155 [PMID: 18613834 DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00639.x]
- 84 Anthony RS, Mckelvie ND, Craig JI, Parker AC. Fas antigen (CD95) expression in peripheral blood progenitor cells from patients with leukaemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998; **30**: 449-458 [PMID: 9711907]
- 85 Ogawa S, Sakaguchi K, Takaki A, Shiraga K, Sawayama T, Mouri H, Miyashita M, Koide N, Tsuji T. Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; **15**: 69-75 [PMID: 10719750 DOI: 10.1046/j.1440-1746.2000.02044.x]
- 86 Tsirikoni A, Kyriakou DS, Rigopoulou EI, Alexandrakis MG, Zachou K, Passam F, Dalekos GN. Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; **42**: 393-399 [PMID: 15710223 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.11.023]
- 87 Pittoni V, Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002; **1**: 154-161 [PMID: 12849009 DOI: 10.1016/S1568-9972(02)00032-0]
- 88 Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; **76**: 969-976 [PMID: 7511063 DOI: 10.1016/0092-8674(94)90375-1]
- 89 Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, Kanda T, Kojima H, Fukai K, Suzuki Y, Hata A, Saisho H. Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 1322-1329 [PMID: 15929764 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41053.x]
- 90 Agarwal K, Czaja AJ, Donaldson PT. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis. *Tissue Antigens* 2007; **69**: 227-235 [PMID: 17493146 DOI: 10.1111/j.1399-0039.2006.00794.x]
- 91 Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Bernal W, Czaja AJ, Donaldson PT. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1999; **30**: 851-856 [PMID: 10498633 DOI: 10.1002/hep.510300412]
- 92 Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; **117**: 645-652 [PMID: 10464141 DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70458-0]
- 93 Bittencourt PL, Palácios SA, Cançado EL, Porta G, Drigo S, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, Goldberg AC. Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor alpha polymorphisms at position -308. *J Hepatol* 2001; **35**: 24-28 [PMID: 11495038 DOI: 10.1016/S0168-8278(01)00072-1]
- 94 Fan LY, Zhong RQ, Tu XQ, Pfeiffer T, Feltens R, Zhu Y, Zhou L. Genetic association of tumor necrosis factor (TNF)-alpha polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune liver diseases in a Chinese population. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; **12**: 160-162 [PMID: 15059302]
- 95 Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Ichijo T, Matsumoto A, Tanaka E, Kiyosawa K. Genetic analysis of the HLA region of Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J*

- Hepatology* 2005; **42**: 578-584 [PMID: 15763345 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.12.019]
- 96 **Paladino N**, Flores AC, Fainboim H, Schroder T, Cuarterolo M, Lezama C, Ballerga EG, Levi D, Tanno H, Costanzo G, Arruvito L, Fainboim L. The most severe forms of type I autoimmune hepatitis are associated with genetically determined levels of TGF-beta1. *Clin Immunol* 2010; **134**: 305-312 [PMID: 19962351 DOI: 10.1016/j.clim.2009.11.004]
- 97 **Szabo SJ**, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; **100**: 655-669 [PMID: 10761931 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80702-3]
- 98 **Chen S**, Zhao W, Tan W, Luo X, Dan Y, You Z, Kuang X, Wang Y, Deng G. Association of TBX21 promoter polymorphisms with type 1 autoimmune hepatitis in a Chinese population. *Hum Immunol* 2011; **72**: 69-73 [PMID: 20977921 DOI: 10.1016/j.humimm.2010.10.019]
- 99 **Lamers MM**, van Oijen MG, Pronk M, Drenth JP. Treatment options for autoimmune hepatitis: a systematic review of randomized controlled trials. *J Hepatol* 2010; **53**: 191-198 [PMID: 20400196 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.037]
- 100 **Ferreira AR**, Roquete ML, Penna FJ, Toppa NH, Castro LP. Type 1 autoimmune hepatitis in children and adolescents: assessment of immunosuppressive treatment withdrawal. *J Pediatr (Rio J)* 2005; **81**: 343-348 [PMID: 16106321 DOI: 10.1590/S0021-75572005000500014]

P- Reviewers Komatsu H, Sonzogni A **S- Editor** Wen LL
L- Editor A **E- Editor** Li JY



2.2- Artigo de revisão 2

Title: The role of genetic and immune factors for the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis in childhood

Running title: Immunogenetic factors in primary sclerosing cholangitis in childhood

Authors: Priscila Menezes Ferri^{1*}, Ana Cristina Simões e Silva^{1,2,3}, Soraya Luiza Campos Silva¹, Diego Junior Queiroga de Aquino¹, Eleonora Druve Tavares Fagundes¹, Débora Marques de Miranda^{1,2}, Alexandre Rodrigues Ferreira¹

Priscila Menezes Ferri, MD, *Professor of Pediatrics, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil. E-mail: pmferri.liu@gmail.com*

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD, *Professor of Pediatrics, UFMG, Brazil. E-mail: acssilva@hotmail.com*

Soraya Luiza Campos Silva, *Medical Student, UFMG, Brazil. E-mail: sorayalcs@yahoo.com.br*

Diego Junior Queiroga de Aquino, *Medical Student, UFMG, Brazil. E-mail: djqaquino@gmail.com*

Eleonora Druve Tavares Fagundes, MD, PhD, *Professor of Pediatrics, UFMG, Brazil. E-mail: eleonoradruve@uol.com.br*

Débora Marques de Miranda, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: debora.m.miranda@gmail.com*

Alexandre Rodrigues Ferreira, MD, PhD, *Professor of Pediatrics, UFMG, Brazil. E-mail: ferallex1403@gmail.com*

1. Department of Pediatrics, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100, Brazil
2. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, INCT-MM, CNPq-FAPEMIG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
3. Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, room #281, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100

Author contributions: Miranda DM, Fagundes ED, Ferreira AR, Simões e Silva AC designed the research; Ferri PM, Silva SLC and Aquino DJQ performed the research; Miranda DM, Ferri PM, Ferreira AR and Simões e Silva AC wrote the paper; all authors reviewed final version.

Financial support: CAPES, INCT-MM (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573646/2008-2).

***Correspondance to:** Priscila Menezes Ferri, Department of Pediatrics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, room #264. Zip code: 30130-100, Brazil. **E-mail:** pmferri.liu@gmail.com **Telephone:** +55 0 31 3409-9772 **Fax:** +55 0 31 3409-9772

ABSTRACT

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a rare cholestatic liver disease characterized by chronic inflammation of the biliary tree resulting in liver fibrosis that predominates on male with less than 40 years. The diagnostic of PSC is based on clinical, laboratory and image findings. Differences in clinical and laboratory findings were observed in young patients include higher incidence of overlap syndrome, higher serum levels of aminotransferases and gama-glutamyl transferase and lower incidence of serious complications such as cholangiocarcinoma. In a spite of the detection of several HLA variants as associated factors in large multicentre cohorts of adult patients, the exact role and pathways of these susceptibility genes remain to be determined in pediatric population. Besides, the literature supports a role for an altered immune response to pathogens in the pathogenesis of PSC. This phenomenon contributes to abnormal immune system activation and perpetuation of an inflammatory process.

Since these findings have been insufficient to characterize and determine the outcome, we propose a review of literature commenting how the immune and genetic factors could help on diagnosis and treatment decisions in child population.

Key Words: Primary sclerosing cholangitis, Genetics, Immunophenotype, Autoimmune disease, Human leukocyte antigens

Introduction

Autoimmune liver diseases are infrequent in children and adolescents, but, when diagnosed, prompt treatment has utmost importance. Among these conditions, primary sclerosing cholangitis (PSC) is a rare cholestatic liver disease characterized by chronic inflammation of the biliary tree resulting in liver fibrosis. An important factor for evolution to cirrhosis is the toxic effect of bile stasis.^{1,2} Contrasting the female predominance of many autoimmune diseases, approximately 2/3 of the PSC patients are males with less than 40 years.³

PSC has a wide-ranging clinical presentation, from asymptomatic patients to chronic liver disease.^{4,5} As a result, the diagnosis can be a big challenge, especially in young patients. Cholestatic bile diseases usually are associated with other autoimmune conditions, such as ulcerative colitis (UC), autoimmune hepatitis (AIH) and autoimmune pancreatitis, referred as the overlap syndromes.^{6,7} The named AIH-PSC syndrome is more frequent in children and adolescents than in adult patients; where in patients course with typical features of PSC in cholangiography or histology, associated to laboratory and histological characteristics of AIH. In AIH-PSC, the reaction to treatment is also different, since patients have better response to immunosuppression than the isolated form of PSC.⁷

The diagnostic of PSC is based on clinical, laboratory and image findings. Mild to severe chronic cholestatic biochemical profile can be present.⁸ Endoscopic retrograde cholangiography is considered the golden standard method and it shows multifocal areas of strictures of intra and/or extra-hepatic bile ducts, with intervening segments of normal or dilated ducts.^{8,9} However, magnetic resonance cholangiography (MRC) is also considered a good option for PSC diagnosis, being a non-invasive and reliable method.^{8,10,11}

Some autoantibodies can be useful in detecting PSC. Serum atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) is the most common autoantibody detected in PSC.^{12,13} Followed by anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA), which also has a high frequency even in the absence of advanced disease or inflammatory bowel disease (IBD).¹⁴ Other autoantibodies such as antinuclear antibody (ANA) and liver kidney microsomal type 1 antibody (anti-LKM1) can be positive in PSC patients, but with lack of specificity to help the laboratory confirmation of the disease.¹⁵

PSC has no effective medical treatment and, in many cases, the disease will lead to cirrhosis and end-stage liver disease with need of liver transplantation.^{1,5,16,17} Ursodesoxycolic acid (UDCA) is used as a palliative treatment option, without interfering on clinical outcome.^{18,19} Since clinical tools have been insufficient to characterize and to predict the outcome, the aim of this review is to summarize evidence from literature about the potential role of immune and genetic factors on the pathogenesis of PSC in pediatric patients.

Genetic factors

The pathogenesis of PSC is still not fully understood, but a complex interaction between genetic, immunological and environmental factors with breakdown of self-tolerance has been reported.^{13,20} Studies have shown a strong genetic predisposition in PSC, with first-degree relatives exhibiting 9 to 39 fold increased risk to develop the disease.²¹ Genome studies showed that this genetic tendency is mainly associated with Human Leukocyte Antigen (HLA) from major histocompatibility complex II (MHC II) locate on chromosome 6p21.^{22,23,24,25,26} Some haplotypes are considered as main susceptibility factors. HLA-B and HLA-DRB1 alleles are the most important ones. Among them, the most frequent are HLA-A1-B8-DRB1*0301-DQB1*0201; HLA-DRB1*1301-DCB1*0603 and HLA-DRB1*1501-DQB1*0602.^{22,23,24,27,28} As protective haplotypes, HLA-DRB1*04-DQB1*0302 and HLA-DRB1*0701-DQB1*0303 have been pointed.^{22,23,28} In a spite of the detection of several HLA variants as associated factors in large multicentre cohorts of adult patients, the exact role and pathways of these susceptibility genes remain to be determined in pediatric population.²²⁻²⁶

Table 1 is a compilation of relevant studies that have investigated the influence of MHC II antigens on PSC. The number of children evaluated in these studies is also show.

Table 1: Publications about major histocompatibility class II human leukocyte antigens and its association with primary sclerosing cholangitis patients.

Reference	Total N° of patients/controls (N° of children and adolescents)	What was evaluated	Conclusions
Farrant <i>et al</i> ²⁹ , 1992	71/68 (0)	HLA-DRB, DQA and DQB	HLA-DRB3*0101 was the most associated allele, with reduced survival of patients with it. DRB5*0101 was another susceptibility allele and DRB4*0101 demonstrated a likely protective function.
Amar <i>et al</i> ³⁰ , 1992	15/no control (0)	HLA-DRB3	No apparent association of the alleles of the DRB3 locus in the Israeli population.
Olerup <i>et al</i> ³¹ , 1995	75/250 (not cited)	HLA-DR and DQ	Association with DRB1*1301, DQAI*0103, DQBI*0603 haplotype was confirmed, whereas DRB1*04 was only slightly underrepresented. No difference was observed in age, presentation, liver function, histological stage or survival between patients with different positive alleles.
Leidenius <i>et al</i> ³² , 1995	24/106 (not cited)	HLA-A, B, C and DR	HLA-B8 and DR3 (DRB1*03) were associated with primary sclerosing cholangitis.
Wilschanski <i>et al</i> ³³ , 1995	27/no control (all children)	HLA-B and HLA-DR	An increased incidence of HLA B8 and DR2 (DRB1*15) but not DRw52a (DRB3*0101) was found.
Spurkland <i>et al</i> ²⁷ , 1999	256/764 (not cited)	HLA-DR and DQ	Increased frequencies of DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*02; DRB1*13-DQA1*0103-DQB1*0603 and DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotypes were observed. PSC was negatively associated with DRB1*04-DQB1*0302 haplotype.

Reference	Total N° of patients/controls (N° of children and adolescents)	What was evaluated	Conclusions
Boberg <i>et al</i> ³⁴ , 2001	265/no control (yes, but the number was not cited)	HLA-DR and DQ	<p>DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*02 (i.e. DR3, DQ2) heterozygous genotype was associated with an increased risk of death or liver transplantation.</p> <p>Presence of a DQ6 encoding haplotype (DQB1*0603 or DQB1*0602) in DR3, DQ2 negative individuals was associated with a reduced risk of death or liver transplantation.</p>
Donaldson <i>et al</i> ²⁸ , 2002	148/134 (0)	HLA-DR and DQ	<p>Associations with the DRB3*0101-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 and DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603 haplotypes were confirmed.</p> <p>Protective influence of the DRB1*04-DQB1*0302 haplotype was reaffirmed.</p> <p>A previously unreported protective haplotype was found: DRB1*0701-DQB1*0303.</p>
Bittencourt <i>et al</i> ³⁵ , 2002	63/83 (27)	HLA-B, DRB1, DQB1	<p>No increase in the frequency of HLA-B, DRB3, DRB4, or DRB5 alleles was observed.</p> <p>The frequency of HLA-DRB1*1301 and HLA-DQB1*06 was significantly increased in PSC patients.</p>
Neri <i>et al</i> ³⁶ , 2003	64/183 (0)	HLA-DRB1, HLA-DQB1 and HLA-B	<p>Frequencies of DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0102, DRB1*16-DQA1*0102-DQB1*0502 and DRB1*04-DQA1*03-DQB1*0301 haplotypes were more elevated in PSC patients.</p> <p>DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*02 haplotype frequency was significantly decreased in patients.</p>

Reference	Total N° of patients/controls (N° of children and adolescents)	What was evaluated	Conclusions
Karlsen <i>et al</i> ²² , 2010	285/298 (yes, but the number was not cited)	HLA-DR and DQ	The strongest association was detected for HLA-B*08 and associations with the DRB1 alleles -DRB1*03, -DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*1301 also were confirmed.
Hov <i>et al</i> ³⁷ , 2010	78/79 (not cited)	HLA-DRB1, HLA-C	Positive association of PSC with HLA-DRB1*15, -DRB1*03, -DRB1*04 and -DRB1*1301 confirmed. A protective association with HLA-DRB1*0701 was found.
Wang <i>et al</i> ³⁸ , 2014	31/42 (all children)	HLA-DR haplotypes	Frequencies of homozygous HLA-DRB1*0301 (DR3) genes and haplotype A1-B8-DR3 were higher in patients. Frequencies of disease-protective genes DR4 and/or DR15 were lower in the patients.
Næss <i>et al</i> ³⁹ , 2014	365/368 (yes, but the number was not cited)		HLA-DRB1*1301-DQB1*0603 and -DRB1*1501 haplotypes conferred risk for PSC. HLA-DRB1*04-DQB1*03, DRB1*0701-DQ*0303 and DR13:XX (all non-13:01 alleles)-DQB1*06 demonstrated a protective effect.

HLA: Human leukocyte antigen; MHC: Major histocompatibility complex; PSC: primary sclerosing cholangitis

Other studies have proposed the existence of MHC class I region genes and non-HLA risk loci for PSC, supporting that other genetic factors take part in the pathogenesis of the disease. Wiencke *et al*⁴⁰ evaluated the extended HLA class I region genes as contributing factors to modulate immune response or to confer susceptibility in PSC patients. The authors found a significant association with alleles MIB*349;

D6S265*122, D6S464*209 and D6S2225*147; all them secondary to DR3 (HLA-DRB1*03) associations.⁴⁰ D6S265*122 was also associated with DR6.⁴⁰ The study of Karlsen *et al*⁴¹ showed that killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA class I ligands can also be associated with PSC.

Norris *et al*⁴² described an association between the MICA*008 allele and PSC. MICA*008 is part of a group of polymorphic genes on chromosome 6 and works as a stress and heat shock inducible molecule that activate inflammatory response as a ligand for $\gamma\delta$ T cells, natural killer (NK) (CD56+) cells and cells expressing the NKG2D receptor.⁴²

Non-HLA findings include modifications in genes related to autoimmunity (IL2/IL2RA), bile acid toxicity (GPBAR1) and mechanisms related to concomitant IBD (IL2/IL21, ILR2A, CARD9, MST1, Fut2 and SIK2).^{24,43} Karlsen *et al*²² also investigated genome-wide association in PSC. These authors detected a susceptibility variant of importance for inflammatory conditions at chromosome *13q31*, with GPC5/GPC6 as a candidate to represent this association.²² Despite its involvement in inflammatory pathways, there is presently no knowledge on the function of GPC6 in the liver and bile ducts and more studies are needed to clarify the details of this involvement.

As shown, most of these studies evaluated only adults, creating a gap in relation to the findings of patients diagnosed in childhood. Indeed, PSC in children seems to be different from the disease in adults.^{44,45} In this regard, differences in clinical and laboratory findings observed in young patients include higher incidence of overlap syndrome, higher serum levels of aminotransferases and gamma-glutamyl transferase, and lower incidence of serious complications such as cholangiocarcinoma.⁴⁴ Thus, the results obtained for adult patients may not be valid for children. Further studies are needed to evaluate the influences of immunogenetic factors in this age group.

Immune factors

The literature supports a role for an altered immune response to pathogens in the pathogenesis of PSC.^{13,46} This phenomenon contributes to abnormal immune system activation and perpetuation of an inflammatory process.^{13,46} Cholangiocytes, after antigenic stimulus, release pro-inflammatory mediators that stimulate immune cells.

Toll-like receptors (TLRs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) interact by promoting a persistent inflammatory environment for cholangiocytes.^{47,48} TLR activation can increase the expression of interleukin (IL)-6 and of cluster for differentiation 44 (CD44) that acts as an adhesion molecule for lymphocytes.⁴⁷ Along with this, tumor necrosis factor alfa (TNF- α), IL-6 and IL-8 released by cholangiocytes and immune cells, trigger the recruitment and activation of T lymphocytes, macrophages, neutrophils, NK and mesenchymal cells.^{13,49,50,51,52} An increased number of NK cells in peripheral blood and the presence of an increased number of activated lymphocytes are immune changes that have been observed in PSC patients.^{52,53} Despite that, Bo *et al*⁵⁴ showed that T lymphocytes function can be impaired in PSC patients when compared with health controls.

There are some hypotheses about how cytokines and adhesion molecules may contribute to PSC pathogenesis. In this context, lymphocytes express specific receptors, $\alpha 4\beta 7$ and CCR9, being these cells responsible for interferon (IFN)- γ production, which, in turn, enhances inflammatory stimuli.^{55,56} Additionally, due to the release of cytokines as CCL28, CXCL12 and CXCL16 and the presence of activated lymphocytes, *naive* T cells can be primed to T helper 1-cells.^{57,58} Besides this, Martin *et al*⁵⁹ showed that $\gamma\delta^+$ cells expressing CD45RO and IL-2 can participate of an activated memory mechanism that maintains the inflammatory process. Sebode *et al*⁶⁰ had also described a reduction of regulatory immune cells as FOXP3⁺ cells and T reg cells in PSC patients. To date, increased production of inflammatory cytokines with higher levels of IL-17, IL-21 and TNF- α and IL-17A expressing lymphocytes can be found around bile ducts.⁶¹

The CCR5 (chemokine receptor 5) is responsible for the recruitment of activated lymphocytes via portal expression of CCR5 ligands.^{62,63} CCR5 also contributes to generation of T helper 1 immune response.^{63,64} Despite controversial findings, some studies report that CCR5-Delta32 deletion is associated with significant reduction in cell surface expression of this chemokine receptor, thus compromising lymphocytes activation.^{62,63,64} While Eri *et al*⁶³ showed that CCR5-Delta32 allele frequency was significantly higher in PSC compared to controls, Melun *et al*⁶⁴ did not find any statistically significant difference in the occurrence of this mutation in patients and controls.

Some studies showed that mucosal addressin cell adhesion molecule (MAdCAM-1) plays an important role in T-lymphocyte recruitment to the liver tissue

derived from the gut by the connection with β 2-integrin ligand.^{56,62,65} This complementary mechanism explains the hepatic recruitment of mucosal lymphocytes in inflammatory liver diseases. For patients with IBD and associated PSC, it has been viewed as a potential therapeutic target.⁶⁶ There are studies evaluating anti-adhesion molecule therapies, but yet without solid results.⁶⁶

Liaskou *et al*⁶⁷ showed that, when compared with CD28⁺ T cells, activated CD28⁻ T cells produce high levels of interferon γ and TNF α , inducing up-regulation of intercellular cell adhesion molecule-1, HLA-DR and CD40, which are important ligands for immune activated T cells. The authors also described significantly greater proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ cells that infiltrate in liver tissue of patients with PSC, leading to a pro-inflammatory environment rich in TNF α .⁶⁵

Concluding remarks

In conclusion, HLA class I and class II are shown to be the main risk factors for PSC in the MHC, but it is time to consolidate available information and to translate research findings into applicable knowledge for clinical practice. Studies with children are infrequent, and the findings obtained in adults should not be extrapolated for this age group. Changes in immune response to pathogens, activation of T lymphocytes and release of inflammatory and adhesion molecules also contribute to the pathogenesis of PSC. More studies are clearly needed to unveil the influence of genetic and immune factors in the pathogenesis of PSC in pediatric patients and how these markers can be used as diagnostic tools and/or therapeutic targets.

References

1. Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2013; 382:1587-99. [PMID: 23810223 DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60096-3]
2. Chapman RW, Arbogh BA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, *et al.* Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut* 1980; 21:870-77. [PMID: 7439807]
3. Schruppf E, Boberg KM. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15(4):553-62. [PMID: 11492967]
4. Eaton JE, Talwalkar JA, Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* 2013; 145:521-36. [PMID: 23827861 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.06.052]
5. Singh S, Talwalkar JA. Primary sclerosing cholangitis: Diagnosis, prognosis, and management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:898-907. [PMID: 23454027 DOI: 10.1016/j.cgh.2013.02.016]
6. Gohlke F, Lohse AW, Dienes HP, Löhr H, Märker-Hermann E, Gerken G, *et al.* Evidence for an overlap syndrome of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1996; 24:699-705. [PMID: 8835745]
7. Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001; 33(3):544-53. [PMID: 11230733]
8. Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney DM, Boberg KM, Shneider B, *et al.* American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010; 51:660-678. [PMID: 20101749 DOI: 10.1002/hep.23294]
9. Gotthardt D, Stiehl A. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in diagnosis and treatment of primary sclerosing cholangitis. *Clin Liver Dis* 2010; 14:349-58. [PMID: 20682240 DOI: 10.1016/j.cld.2010.03.010]
10. Dave M, Elmunzer BJ, Dwamena BA, Higgins PD. Primary sclerosing cholangitis: Meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2010; 256:387-96. [PMID: 20656832 DOI: 10.1148/radiol.10091953]

11. Ahrar H, Jafarpishe MS, Helmatnia A, Solouki R, Emami MH. Magnetic resonance cholangiography compared with endoscopic retrograde cholangiography in the diagnosis of primary sclerosing cholangitis. *J Res Med Sci* 2014; 19(12):1150-4. [PMID: 25709656]
12. Terjung B, Herzog V, Worman HJ, Gestmann I, Bauer C, Sauerbruch T, *et al.* Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel disease and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. *Hepatology* 1998; 28:332-40. [PMID: 9695994]
13. Liaskou E, Hirschfield GM, Gershwin ME. Mechanisms of tissue injury in autoimmune liver diseases. *Semin Immunopathol* 2014; 36:553-568. [PMID: 25082647 DOI: 10.1007/s00281-014-0439-3]
14. Terjung B, Sohne J, Lechtenberg B, Gottwein J, Muennich M, Herzog V, *et al.* p-ANCA in autoimmune liver disorders recognize human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* 2010; 59:808-16. [PMID: 19951907 DOI: 10.1136/gut.2008.157818]
15. Maggiore G, Riva S, Sciveres M. Autoimmune diseases of the liver and biliary tract and overlap syndromes in childhood. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2009; 55(1):53-70. [PMID:19212308]
16. Broomé U, Olsson R, Lööf L, Bodemar G, Hulcrantz R, Danielsson A, *et al.* Natural History and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996; 38:610-15. [PMID: 8707097]
17. Card TR, Solaymani-Dodaran M, West J. Incidence and mortality of primary sclerosing cholangitis in the UK: a population-based cohort study. *J Hepatol* 2008; 48: 939-944. [PMID: 18433916 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.02.017]
18. Olsson R, Boberg KM, de Muckadell OS, Lindgren S, Hultcrantz R, Folvik G, *et al.* High-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: A 5-year multicenter, randomized, controlled study. *Gastroenterology* 2005; 129:1464-1472. [PMID: 16285948]
19. Lindor KD, Kowdley KV, Luketic VA, Harrison ME, McCashland T, Befeller AS, *et al.* High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2009; 50:808-814. [PMID: 19585548 DOI: 10.1002/hep.23082]
20. Bowlus CL. Cutting edge issues in primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41:139–150. [PMID: 21170605 DOI: 10.1007/s12016-010-8221-3]

21. Bergquist A, Lindberg G, Saarinen S, Broomé U. Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives. *J Hepatol* 2005; 42:252–256. [PMID: 15664252]
22. Karlsen TH, Franke A, Melum E, Kaser A, Hov JR, Balschun T, *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2010; 138:1102–1111. [PMID: 19944697 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.11.046]
23. Melum E, Franke A, Schramm C, Weismuller TJ, Gotthardt DN, Offner FA, *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nat Genet* 2011; 43:17–19. [PMID: 21151127 DOI: 10.1038/ng.728]
24. 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. *J Hepatol* 2012; 57:366–375. [PMID: 22521342 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.03.031]
25. Srivastava B, Mells GF, Cordell HJ, Muriithi A, Brown M, Ellinghaus E, *et al.* Fine mapping and replication of genetic risk loci in primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47:820–826. [PMID: 22554193 DOI: 10.3109/00365521.2012.682090]
26. Liu JZ, Hov JR, Folseraas T, Ellinghaus E, Rushbrook SM, Doncheva NT, *et al.* Dense genotyping of 564 immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet* 2013; 45:670–675. [PMID: 23603763 DOI: 10.1038/ng.2616]
27. Spurkland A, Saarinen S, Boberg KM, Mitchell S, Broome U, Caballeria L, *et al.* HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations. *Tissue Antigens* 1999; 53:459–469. [PMID: 10372541]
28. Donaldson PT, Norris S. Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity* 2002; 35(8):555–564. [PMID: 12765483]
29. Farrant JM, Doherty DG, Donaldson PT, Vaughan RW, Hayllar KM, Welsh KI, *et al.* Amino acid substitutions at position 38 of the DR beta polypeptide confer susceptibility to and protection from primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1992; 16(2):390-5. [PMID: 1639348]

30. Amar A, Brautbar C, Goldin E, Sherman L, Bar-meir S, Shouval D, *et al.* Serological and molecular analysis of HLA in Israeli primary sclerosing cholangitis patients. *Eur J Immunogenet* 1992;19(5):295-302. [PMID:1420116]
31. Olerup O, Olsson R, Hultcrantz R, Broome U. HLA-DR and HLA-DQ are not markers for rapid disease progression in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1995; 108(3):870-8. [PMID:7875491]
32. Leidenius MH, Koskimies SA, Kellokumpu IH, Höckerstedt KA. HLA antigens in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *APMIS* 1995; 103(7-8):519-24. [PMID: 7576567]
33. Wilschanski M, Chait P, Wade JA, Davis L, Corey M, St Louis P, *et al.* Primary sclerosing cholangitis in 32 children: clinical, laboratory, and radiographic features, with survival analysis. *Hepatology* 1995; 22(5):1415-22. [PMID: 7590657]
34. Boberg KM, Spurrkland A, Rocca G, Egeland T, Saarinen S, Mitchell S, *et al.* The HLA-DR3, DQ2 heterozygous genotype is associated with an accelerated progression of primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(8):886-90. [PMID: 11495087]
35. Bittencourt PL, Palacios SA, Cançado EL, Carrilho FJ, Porta G, Kalil J, *et al.* Susceptibility to primary sclerosing cholangitis in Brazil is associated with HLA-DRB1*13 but not with tumour necrosis factor alpha -308 promoter polymorphism. *Gut* 2002;51(4):609-10. [PMID:12235090]
36. Neri TM, Cavestro GM, Seghini P, Zanelli PF, Zanetti A, Savi M, *et al.* Novel association of HLA-haplotypes with primary sclerosing cholangitis (PSC) in a southern European population. *Dig Liver Dis* 2003;35(8):571-6. [PMID:14567462]
37. Hov JR, Lleo A, Selmi C, Woldseth B, Fabris L, Strazzabosco M, *et al.* Genetic associations in Italian primary sclerosing cholangitis: heterogeneity across Europe defines a critical role for HLA-C. *J Hepatol* 2010; 52(5):712-7. [PMID: 20347497 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.11.029]
38. Gregorio GV1, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, Mieli-Vergani G., *et al.* Autoantibody and human leukocyte antigen profiles in children with autoimmune liver disease and their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58(4):457-62. [PMID: 24231645 DOI: 10.1097/MPG.0000000000000245]

39. Næss S, Lie BA, Melum E, Olsson M, Hov JR, Croucher PJ, *et al.* Refinement of the MHC risk map in a Scandinavian primary sclerosing cholangitis population. *PLoS One* 2014; 9(12): e114486. [PMID: 25521205 DOI: 10.1371/journal.pone.0114486]
40. Wiencke K, Karlsen TH, Boberg KM, Thorsby E, Schrumpf E, Lie BA, *et al.* Primary sclerosing cholangitis is associated with extended HLA-DR3 and HLA-DR6 haplotypes. *Tissue Antigens* 2007; 69(2):161-9. [PMID: 17257319]
41. Karlsen TH, Boberg KM, Olsson M, Sun JY, Senitzer D, Bergquist A, Schrumpf E, *et al.* Particular genetic variants of ligands for natural killer cell receptors may contribute to the HLA associated risk of primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2007; 46(5):899-906. [PMID: 17383044]
42. Norris S, Kondeatis E, Collins R, Satsangi J, Clare M, Chapman R, *et al.* Mapping MHC-encoded susceptibility and resistance in primary sclerosing cholangitis: the role of MICA polymorphism. *Gastroenterology* 2001; 120:1475–1482. [PMID: 11313318]
43. Mells GF, Kaser A, Karlsen TH. Novel insights into autoimmune liver diseases provided by genome-wide association studies. *J Autoimmun* 2013; 46:41–54. [PMID: 23931959 DOI: 10.1016/j.jaut.2013.07.004]
44. Shneider BL. Diagnostic and Therapeutic Challenges in Pediatric Primary Sclerosing Cholangitis. *Liver Transpl* 2012; 18:277-81. [DOI: 10.1002/lt.22469]
45. Miloh T, Bulut P. Primary Sclerosing Cholangitis during Childhood and Adolescence. *Clinical Liver Disease* 2013; 2(5):215-18. [DOI:10.1002/cld.251]
46. O'Mahony CA, Vierling JM. Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Semin Liver Dis* 2006; 26:3–21. [PMID: 16496229]
47. Xu B, Broome U, Ericzon BG, Sumitran-Holgersson S. High frequency of autoantibodies in patients with primary sclerosing cholangitis that bind biliary epithelial cells and induce expression of CD44 and production of interleukin 6. *Gut* 2002; 51:120–7. [PMID: 12077104]
48. Karrar A, Broomé U, Sodergren T, Jaksch M, Bergquist A, Bjornstedt, *et al.* Biliary epithelial cell antibodies link adaptive and innate immune responses in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2007; 132:1504–1514. [PMID: 17408653]
49. O'Hara SP, Splinter PL, Trussoni CE, Gajdos GB, Lineswala PN, LaRusso NF. Cholangiocyte N-Ras protein mediates lipopolysaccharide-induced interleukin 6

- secretion and proliferation. *J BiolChem* 2011; 286:30352–30360. [PMID: 21757746 DOI: 10.1074/jbc.M111.269464]
50. Hashimoto E, Lindor KD, Homburger HA, Dickson ER, Czaja AJ, Wiesner RH, et al. Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:1049–1055. [PMID: 8231268]
 51. Whiteside TL, Lasky S, Si L, Van Thiel DH. Immunologic analysis of mononuclear cells in liver tissues and blood of patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1985; 5:468-474. [PMID: 3158582]
 52. Snook JA, Chapman RW, Sachdev GK, Heryet A, Kelly PM, Fleming KA, Jewell DP. Peripheral blood and portal tract lymphocytes populations in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1989; 9:36-41. [PMID: 2570096]
 53. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, Panasiuk B, Wysocka J. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood in primary sclerosing cholangitis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1289–1291. [PMID: 15362735]
 54. Bo X, Broomé U, Remberger M, Sumitran-Holgersson S. Tumor necrosis factor alpha impairs function of liver derived T lymphocytes and natural killer cells in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2001; 49:131-141. [PMID: 11413121]
 55. 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. *J Exp Med* 2004; 200:1511–17. [PMID: 15557349]
 56. Grant AJ, Lalor PF, Hubscher SG, Briskin M, Adams DH. MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease). *Hepatology* 2001; 33:1065–72. [PMID: 11343233]
 57. Miles A, Liaskou E, Eksteen B, Lalor PF, Adams DH. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1257–G1267. [PMID: 18308860 DOI: 10.1152/ajpgi.00266.2007]
 58. Neumann K, Kruse N, Szilagyi B, Erben U, Rudolph C, Flach A, et al. Connecting liver and gut: murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4⁺ T

- cells via retinoic acid. *Hepatology* 2012; 55:1976–84. [PMID: 22109893 DOI: 10.1002/hep.24816]
59. Martins EB, Graham AK, Chapman RW, Fleming KA. Elevation of gamma delta T lymphocytes in peripheral blood and livers of patients with primary sclerosing cholangitis and other autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1996; 23:988–993. [PMID: 8621180]
 60. Sebode M, Peiseler M, Franke B, Schwinge D, Schoknecht T, Wortmann F, *et al.* Reduced FOXP3+ regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL-2RA gene polymorphisms. *J Hepatol* 2014; 60(5):1010-6. [PMID: 24412607 DOI: 10.1016/j.jhep.2013.12.027]
 61. Katt J, Schwinge D, Schoknecht T, Quaas A, Sobottka I, Burandt E, *et al.* Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2013; 58:1084–1093. [PMID: 23564624 DOI: 10.1002/hep.26447]
 62. Karlsen TH, Schrumpt E, Boberg KM. Genetic epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(41):5421-5431. [PMID: 17907284]
 63. Eri R, Jonsson JR, Pandeya N, Purdie DM, Clouston AD, Martin N, *et al.* CCR5-Delta32 mutation is strongly associated with primary sclerosing cholangitis. *Genes Immun* 2004; 5:444-450. [PMID: 15215889]
 64. Melum E, Karlsen TH, Broomé U, Thorsby E, Schrumpt E, Boberg KM, *et al.* The 32-base pair deletion of the chemokine receptor 5 gene (CCR5-Delta32) is not associated with primary sclerosing cholangitis in 363 Scandinavian patients. *Tissue Antigens* 2006; 68:78-81. [PMID: 16774544]
 65. Yang X, Cullen SN, Li JH, Chapman RW, Jewell DP. Susceptibility to primary sclerosing cholangitis is associated with polymorphisms of intercellular adhesion molecule-1. *J Hepatol* 2004; 40:375-9. [PMID: 15123348]
 66. Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World J Gastroenterol* 2006; 12(29):4628-35. [PMID: 16937430]
 67. Liaskou E, Jeffery LE, Trivedi PJ, Reynolds GM, Suresh S, Bruns T, *et al.* Loos of CD28 expression by liver-infiltrating T cells contributes to pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2014; 147:221-232. [PMID: 24726754 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.003]

3 – OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e monócitos para marcadores de superfície celular relacionados à inflamação e autoimunidade, em crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite autoimune tipo 1, associada ou não à colangite autoimune, e na colangite esclerosante primária, comparando pacientes com grupo controle.

3.2 OBJETIVOS COMPLEMENTARES

- Descrever os achados clínicos de coorte de crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite autoimune tipo 1, associada ou não à colangite autoimune, e na colangite esclerosante primária.
- Mostrar os dados laboratoriais significativos na avaliação dos pacientes.

4 - PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO, PACIENTES, LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo, de uma coorte transversal com 20 pacientes com diagnóstico de HAI tipo 1, 19 pacientes com hepatite autoimune tipo 1 associada à colangite autoimune e 12 com diagnóstico de CEP atendidos no período de janeiro de 1986 a janeiro de 2014. O grupo controle foi composto por 15 crianças e adolescentes, hígidos em avaliação clínica e sem história pessoal ou familiar de doenças autoimunes.

A seleção de pacientes com HAI foi realizada a partir de uma casuística de 134, sendo que dentre esses, 28 tinham diagnóstico de CAI. Foram utilizados como critérios de inclusão no estudo a idade até 18 anos na época do diagnóstico, o acompanhamento regular no serviço e a boa adesão ao tratamento com remissão clínica e laboratorial por pelo menos dois anos, tendo o paciente e seus responsáveis aceitado participar do estudo. Para diferenciação diagnóstica entre HAI e HAI associada à colangite foram utilizados critérios clínicos, propedêutica laboratorial e de imagem e achados histológicos como descrito a seguir.

O diagnóstico de HAI foi estabelecido segundo os critérios do Grupo Internacional para Estudo da HAI, publicados em 1993 e revisados em 1999 e 2008.^{1,2} Todos os pacientes que apresentaram, ao início do tratamento ou durante o acompanhamento, quadro clínico laboratorial sugestivo de acometimento de vias biliares, foram submetidos à

pesquisa de associação do quadro à colangite autoimune. Os principais achados sugestivos dessa associação foram elevação persistente de GGT e/ou má resposta ao tratamento imunossupressor. A colangiorressonância magnética (CRM) foi utilizada para avaliar a presença de alterações em vias biliares, sendo revisada por três hepatologistas experientes da equipe de Hepatologia Pediátrica e dois radiologistas do serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UFMG. A biópsia hepática foi o dado utilizado para a confirmação final do diagnóstico. Os achados histológicos estão descritos a seguir em avaliação histológica.

O diagnóstico da CEP foi realizado por critérios clínicos, laboratoriais e de imagem, com os achados esperados nessa doença. A avaliação de imagem foi realizada pela CRM, também com revisão do laudo pelas equipes de Hepatologia Pediátrica e Radiologia do serviço, e com confirmação histológica, cujos achados estão descritos no item avaliação histológica. Foram selecionados os pacientes com diagnóstico já estabelecido, com idade ao diagnóstico inferior a 18 anos, com acompanhamento regular no serviço e que aceitaram participar do estudo.

Foi realizada investigação para exclusão de outras doenças hepáticas crônicas em todos os pacientes.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os pacientes e integrantes do grupo controle que participaram deste projeto e/ou seus responsáveis foram devidamente esclarecidos sobre a natureza do estudo e o que foi realizado, tendo resguardado o direito de, em caso de recusa, receberem a avaliação e o tratamento indicados (para informação complementar, ver termo de consentimento livre e esclarecido - Anexo B). Foi lido e assinado por pesquisadores, pacientes e grupo controle o termo de consentimento livre e esclarecido. Além disso, as amostras de sangue dos pacientes que aceitaram participar da pesquisa foram colhidas nas ocasiões de suas avaliações clínicas rotineiras.

Os projetos de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. (Anexos C e D).

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

O acompanhamento clínico dos pacientes foi e ainda é realizado no Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da UFMG pela equipe de Hepatologia Pediátrica do serviço. São realizadas avaliações clínicas periódicas a cada 1 a 6 meses, segundo rotina do

serviço e fase de tratamento em que se encontra o paciente. Foram considerados os dados registrados em prontuário, segundo protocolo específico do serviço. Esses dados foram compilados em banco de dados para realização de análise estatística e descrição da casuística. A avaliação clínica inicial consta dos seguintes itens:

1 – Anamnese completa: gênero; idade; tempo de duração das manifestações até o encaminhamento ao ambulatório; evidência de manifestações extra-hepáticas (anemia hemolítica autoimune, tireoidite, artrite, *diabetes mellitus*, artralgia, vitiligo, doença inflamatória intestinal, lesões acneiformes etc.); antecedentes familiares de hepatopatias; antecedentes familiares de doenças autoimunes (*diabetes mellitus*, tireoidite, retocolite ulcerativa, vitiligo, hepatite autoimune, lúpus etc.); e uso de hemotransfusões, medicamentos ou drogas.

Os pacientes foram classificados em quatro formas de apresentação clínica: forma aguda, semelhante ao quadro clínico da hepatite viral aguda; forma crônica (presença de adinamia, anorexia, ascite, hepatomegalia, icterícia intermitente, esplenomegalia); forma de falência hepática grave, com apresentação semelhante à insuficiência hepática fulminante; e forma assintomática quando se tratava de diagnóstico por achado laboratorial isolado ou hepatomegalia detectada ao exame clínico. A HAI foi classificada em tipo 1, no caso de FAN e/ou AML positivos e tipo 2, quando o anti-LKM1 foi positivo isoladamente.

2 – Exame físico: são avaliados e registrados peso, altura, presença de icterícia, ascite, aumento do volume abdominal, telangiectasias, eritema palmar, circulação colateral, aranhas vasculares, tamanho e consistência hepática, esplenomegalia e sinais clínicos de encefalopatia.

4.4 PROPEDEÚTICA COMPLEMENTAR

A avaliação laboratorial inicial, que já faz parte da propedêutica de rotina ao diagnóstico, continha hemograma completo; determinação do tempo de protrombina, atividade de protrombina e determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado; determinação dos níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST), da fosfatase alcalina (FA) e da gamaglutamil transferase (GGT); dosagens das bilirrubinas séricas e das proteínas plasmáticas com fracionamento eletroforético para avaliação principalmente do perfil hepático do paciente.

Foi realizada também pesquisa quantitativa e qualitativa dos autoanticorpos através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI): antinuclear (FAN), antímúsculo liso

(AML), antimicrosomal fígado e rim (anti-LKM1) e citoplasmático antineutrofílico perinuclear (p-ANCA), sendo esse último realizado na suspeita de CEP.

Avaliação laboratorial quantitativa de α 1-antitripsina, cobre e ceruloplasmina sérica, dosagem do cobre urinário de 24 horas; pesquisa de marcadores virais: HBsAg, anti-HBc, anti-HCV 2^a geração e anti-HAV IgM e pesquisa do vírus da hepatite C (HCV), quando sorologia positiva, foram realizadas para exclusão de outras doenças hepáticas. Os dados foram obtidos de registros em prontuário e diretamente no laboratório quando necessário.

Imunofenotipagem

Para esta avaliação a pesquisa contou com apoio financeiro da CAPES, através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular da UFMG (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573646/2008-2).

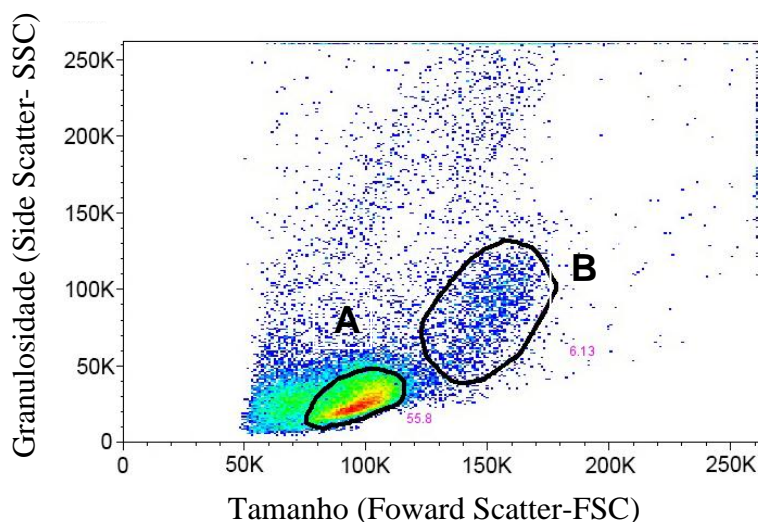
Foi realizada coleta de sangue venoso de aproximadamente 10 mL para imunofenotipagem e estudo dos perfis de marcadores de superfície relacionados à inflamação de linfócitos e monócitos. A coleta foi realizada durante os exames de rotina solicitados para acompanhamento do paciente.

A análise de citometria de fluxo para descrição do perfil de marcadores de superfície de linfócitos e monócitos foi realizada conforme descrito por Torres *et al*³. As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas com utilização de gradiente de Ficoll (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) e posteriormente foram coradas utilizando-se fluorocromos para os marcadores a serem analisados. Os anticorpos associados aos fluorocromos Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) e Cyanin 5 e 7 utilizados para a coloração foram anti-CD4-APCCy7, anti-CD4-Cy7, anti-CD8-FITC, anti-CD8-APC, anti-CD14-FITC, anti-CD45RA-FITC, anti-CD45RO-PE, anti-CTLA4-Cy5, anti-CD69-Cy7, anti-CD28-PE, anti-CD40L-Cy5, anti-HLA-DR-Cy7, anti-CD95L-PE, anti-CD95-Cy5, anti-CD25-Cy7, anti-CCR3-PE, anti-CCR5-Cy5, anti-CD80-Cy5, anti-CD86-APC. Em todos os experimentos também foram utilizados anticorpos isótopos de controle negativo conjugados com fluorocromos de acordo com o anticorpo de referência.

Após fixação e ressuspensão, as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (Guava easy-Cyte, Millipore[®], Darmstadt, Alemanha ou FACSCanto II[®] BD, Califórnia, EUA) numa taxa mínima de 50000 eventos e analisadas pelo software FlowJo 7.5[®] (FlowJo, Oregon, USA). Para uma determinação das células correspondentes a linfócitos e monócitos, determinou-se a região a ser analisada pela construção de *gates* de acordo com

controles de tamanho relativo e granulosidade/complexidade em cada experimento e para cada paciente, sendo um exemplo demonstrado na Figura 1.

Figura 1: Dot-plot representando o método de seleção de *gates* utilizados para linfócitos em A e de monócitos em B.



Foram avaliadas as porcentagens de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e monócitos (CD14⁺) expressando os marcadores de superfície em avaliação. As porcentagens de expressão resultantes foram utilizadas para a comparação entre os grupos através de testes estatísticos descritos no item análise estatística. Os marcadores de superfície analisados foram: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CD25, CD95, CD95L, CCR3, CCR5, CD80, CD86. Nessa avaliação tentou-se pesquisar a ativação de linfócitos e monócitos; e a presença de células de memória e de regulação imunes.

Avaliação radiológica

Conforme rotina do serviço, foram solicitados exames ultrassonográficos de fígado e vias biliares (todos os pacientes) e colangiorrressonância (na suspeita de colangite associada à HAI ou na CEP) sendo, revisados e avaliados por três hepatologistas experientes da equipe de Hepatologia Pediátrica e dois radiologistas do serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Avaliação histológica

As biópsias hepáticas são indicadas no momento do diagnóstico e realizadas tão logo as condições clínicas e laboratoriais do paciente permitam. A avaliação histopatológica foi realizada pela equipe de patologistas do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG.

O achado histológico de hepatite de interface, associada à formação de rosetas, alargamento dos espaços portais por fibrose e infiltrado inflamatório principalmente plasmocitário em espaços periportais, portais e intralobulares representou o quadro histológico de hepatite autoimune. Quando, além desses achados, encontrou-se acometimento de ductos por inflamação com alterações degenerativas do epitélio ductular, podendo haver também ductopenia e proliferação de ductos, confirmou-se o diagnóstico de hepatite autoimune com associação à colangite autoimune.

Os achados de degeneração do epitélio do ducto biliar, infiltração de espaços porta por células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação de ductos associados com diminuição ou ausência de ductos biliares interlobulares e fibrose periductal concêntrica de ductos biliares interlobulares (fibrose "em casca de cebola") foram os achados histológicos utilizados para confirmar a CEP.

Além da classificação histológica do tipo de doença, descrita anteriormente, foram avaliados a graduação e o estadiamento das alterações hepáticas. A graduação é demonstrada pela ausência ou presença de necrose em saca-bocados, necrose confluyente, necrose lítica focal, apoptose, alterações em ductos biliares, inflamação focal e inflamação portal com as respectivas intensidades. Através do estadiamento, avaliaram-se a presença e a quantidade de fibrose; o estágio final foi caracterizado por cirrose incipiente ou definitiva.

4.5 RESPOSTA AO TRATAMENTO

O esquema de tratamento empregado para hepatite autoimune é a associação de prednisona e azatioprina, em tomadas diárias, nas doses de 1 a 2 mg/kg/dia (máximo 60 mg/dia) e 1,5 mg/kg/dia (máximo 100 mg/dia), respectivamente.^{4,5} A primeira reavaliação é realizada com quatro semanas, quando a dose da prednisona é reduzida em um terço (retirados 10 a 20 mg) e posteriormente a cada duas semanas, sendo reduzida a dose em 10 a 5 mg em cada avaliação até atingir 5 mg em dias alternados, mantendo o paciente em remissão clínico-laboratorial. A azatioprina é mantida na dose inicial. Para os pacientes que se apresentam no início do tratamento com leucopenia (global de leucócitos menor que 3.000) e/ou plaquetopenia (menor que 50.000) é iniciada somente prednisona, sendo acrescentado azatioprina após melhora desses parâmetros; caso contrário, mantida somente prednisona. A medicação é fornecida aos pacientes através do Sistema de Medicamentos Especiais do Sistema Único de Saúde.

A resposta ao tratamento foi avaliada segundo os critérios do Grupo Internacional para Estudo da HAI^{1,2}, sendo caracterizada pela melhora clínica e redução das aminotransferases até valores normais ou no máximo duas vezes o maior valor de referência. Remissão completa foi definida como melhora clínica, normalização das aminotransferases e gamaglobulina, autoanticorpos negativos ou em títulos muito baixos e resolução histológica da inflamação, sendo esta última a mais tardia. Por outro lado, a recaída foi representada pelo aumento das transaminases após a remissão ter sido atingida.^{4,5} Foi avaliado também o número de pacientes que necessitaram de transplante hepático devido à não resposta ao tratamento.

O tratamento da colangite esclerosante primária, diferentemente da HAI, foi realizado em todos os pacientes com a utilização do ácido ursodesoxicólico (UDCA).⁷

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS 17® (IBM, New York, USA). A descrição da casuística clínica e laboratorial foi realizada utilizando-se média, mediana, desvio padrão, intervalos e porcentagens. Teste qui-quadrado foi utilizado para comparação de variáveis categóricas.

Os dados relativos à imunofenotipagem foram avaliados por testes não paramétricos utilizando o GraphPad Prism software 5.03® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando que não houve distribuição normal avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações com três ou mais grupos foram realizadas por teste não paramétrico Kruskal-Wallis, não havendo possibilidade de cálculo de intervalo de confiança (IC) por se tratar de comparação de múltiplos grupos. As comparações dos pares de grupos foram realizadas pelo teste Mann-Whitney com cálculo de intervalo de confiança e pelo teste de comparação múltipla de Dunn. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. O intervalo de confiança também foi calculado para as comparações entre os grupos.

O número total de pacientes em cada análise para diferentes marcadores variou de 3-20 devido a problemas experimentais específicos do método (como, por exemplo, marcação ineficiente pelo fluorocromo, perda da amostra na leitura pelo aparelho) que causaram perdas de dados desses pacientes. Estas perdas são inerentes ao método experimental utilizado.

REFERÊNCIAS

- 1- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cançado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M, *et al.* International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938.
- 2- Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW. International Autoimmune Hepatitis Group Report. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48(1):169-176.
- 3- Torres KCL, Antonelli LR, Souza AL, Teixeira MM, Dutra WO, Gollob KJ. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. *J Neuroimmunol* 2005; 166:144 – 157.
- 4- Ferreira AR, Roquete MLV, Fagundes EDT, Pimenta JR, Carvalho AR. Hepatite auto-imune em crianças e adolescentes: estudo clínico, diagnóstico e resposta terapêutica. *Revista Médica de Minas Gerais* 2006; 16:243-249.
- 5- Ferreira AR, Roquete MLV, Penna FJ, Toppa NH. Tratamento da hepatite auto-imune em crianças e adolescente. *Revista Médica de Minas Gerais* 2003;13(4):54-67.
- 6- Ferreira AR, Roquete ML, Penna FJ, Toppa NH. Hepatite auto-imune em crianças e adolescentes: estudo clínico, diagnóstico e resposta terapêutica. *J Pediatr* 2002; 78(4):309-314.
- 7- Mieli-Vergani G, Vergani D. Unique features of primary sclerosing cholangitis in children. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 265-8.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Artigo original 1

Authors: Priscila Menezes Ferri^{1*}, Ana Cristina Simões e Silva^{2,4}, Karen Cecília de Lima Torres⁵, Soraya Luiza Campos Silva³, Diego Junior Queiroga de Aquino³, Eleonora Druve Tavares Fagundes¹, Débora Marques de Miranda², Alexandre Rodrigues Ferreira¹

Priscila Menezes Ferri, MD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: pmferri.liu@gmail.com*

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: acssilva@hotmail.com*

Karen Cecília de Lima Torres, *Researcher of Laboratory of Biomarkers for Diagnosis and Monitoring in René Rachou Research Center, Fiocruz, Minas Gerais, Brazil. E-mail: kcltorres@gmail.com*

Soraya Luiza Campos Silva, *Student of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: sorayalcs@yahoo.com.br*

Diego Junior Queiroga de Aquino. *Student of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: djqaquino@gmail.com*

Eleonora Druve Tavares Fagundes, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: eleonoradruve@uol.com.br*

Débora Marques de Miranda, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: debora.m.miranda@gmail.com*

Alexandre Rodrigues Ferreira, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: alexfer1403@gmail.com*

1. Division of Gastroenterology of Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
2. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, INCT-MM, CNPq-FAPEMIG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
3. Scientific initiation student of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
4. Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, room #281, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
5. Laboratory of Biomarkers for Diagnosis and Monitoring, René Rachou Research Center – FIOCRUZ/MG, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Zip code: 30190-002

*corresponding author

Author contributions: Fagundes ED, Miranda DM, Ferreira AR designed the research; Ferri PM, Simões e Silva AC, Torres KCL, Silva SLC and Aquino DJQ performed the

research; Ferri PM, Miranda DM and Ferreira AR wrote the paper; all authors reviewed final version.

Supportive foundations: CAPES, INCT-MM (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573646/2008-2).

Correspondance to: Department of Pediatrics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Priscila Menezes Ferri, Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, room #264. Zip code: 30130-100, Brazil. **E-mail:** pmferri.liu@gmail.com **Telephone:** +55 0 31 3409-9772 **Fax:** +55 0 31 3409-9772

Title: Autoimmune hepatitis type 1 and overlap syndrome with cholangitis: immunophenotypic factors in children and adolescents

Abstract:

Objective: The pathophysiology of autoimmune hepatitis (AIH) involves activation of lymphocytes, macrophages and natural killer cells (NK), however it is not known what deregulates the immune system, creating an aggressive environment for hepatic cells. Changes in the expression of some clusters of differentiation (CD) in immune cells might be part of this disruption. The purpose of this study was to characterize immunophenotypic findings of lymphocytes and monocytes from peripheral blood samples of children and adolescents with AIH type 1, AIH type 1 overlap syndrome with cholangitis and controls.

Patients and Methods: Prospective study of a cross-sectional cohort of 20 children and adolescents diagnosed with AIH type 1 and 19 with AIH type 1 overlap syndrome with cholangitis, based in criteria of the International Group for the Study of AIH. The clinical follow-up consists on clinical and laboratory evaluations at each 1-6 months. A control group of healthy children and adolescents with no history of autoimmune diseases was also assessed. Flow cytometry analysis for description of the lymphocyte and monocyte surface marker profile was performed in peripheral blood samples. Surface markers analyzed were: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CD25, CD95, CD95L, CCR3, CCR5, CD80.

Results: The two groups of patients presented similar clinical and laboratory findings, except for GGT levels and gamma globulin, to which the overlap syndrome group had higher values. The patient's groups presented a higher percentage of CD4⁺T cells when compared to controls. In CD4⁺ T cells evaluation, CCR3 expression was higher in both patients group, CD45RA was also high in both patients group, but with significance only in overlap group and CD45RO and CD28 was higher in AIH group. In CD8⁺ T cells, CCR3 expression was higher in both patients group and in overlap group we found a higher expression of CD45RA and CD25 and lower of CD45RO. In monocytes, HLA-DR was the most important finding, being less expressed in both patient's groups.

Conclusion: We describe a complex phenotypic characterization that may be involved in the pathophysiology of AIH, with participation of changes in the immune system regulatory mechanisms represented by cell surface markers. This data shows that even with good clinical and laboratory response by the currently existing criteria, patients still have signs of immune activity and autoimmunity at cellular level.

Key-words: Autoimmune hepatitis, Immunophenotype, Autoimmune disease, Children

Introduction

Autoimmune hepatitis (AIH) is a progressive inflammatory liver disease more prevalent among female.^{1,2} The incidence is high between 10 and 30 years.³ AIH courses with positive autoantibodies as antinuclear antibodies (ANA), anti-smooth muscle antibody (ASMA) and anti-liver/kidney microsome type 1 (anti-LKM1); increased transaminases and immunoglobulin G (IgG).³ Histologically, AIH is characterized by interface hepatitis without a known etiology.³ Besides it is not conclusive, some characteristics are suggestive of AIH: hepatic regeneration with "rosette" formation, piecemeal necrosis with periportal/periseptal lymphocytic infiltrate, "bridging collapse"—a connective tissue collapses and expands from the portal area into the lobule.⁴ There are two types of AIH: types 1, with ANA antibodies and/or anti-SMA; and type 2, with LKM1 anti-antibody. Clinically, AIH may vary from asymptomatic patients with only laboratory abnormalities to fulminant hepatic failure coursing with cirrhosis and liver failure.^{2,3,5,6} The overlap syndrome is more common in children and adolescents, with a prevalence of 2 to 7% in adults and reaching almost 30 to 50% in pediatric population, and is characterized by clinical and laboratory findings from autoimmune hepatitis add to those found in primary sclerosing cholangitis.^{2,3,7,8}

Susceptibility to AIH is associated to the presence of genes related to major histocompatibility complex II (MHC II) specifically to human leukocyte antigen (HLA).⁹ An association has been established with HLA-DR3 and HLA-DR4 in European and American cohorts.¹⁰ In children, the HLA-DRB1*1301 is the most common associated gene to susceptibility to AIH.^{9,11} It is also suggested that these genes may drive the response to treatment and prognosis, however few studies in adults evaluated this association. The pathophysiology involves activation of lymphocytes, primarily T helper, but also B lymphocytes, macrophages and natural killer cells (NK), however it is not known what deregulates the immune system, creating an aggressive environment for hepatic cells.^{12,13} Changes in the expression of some clusters of differentiation (CD) in immune cells might mean this disruption. Some studies have shown possible changes involved, such as decreased number and altered function of CD4⁺ CD25⁺ T lymphocytes and reduced number of natural killer cells, leading to a low

expression of CTLA-4 protein (cytotoxic T lymphocyte- associated protein - 4) that could result on changes of immune response modulation.^{14,15}

Increased expression of CD80 and CD86 in monocytes in hepatic cell inflammatory response, that are responsible for the binding with CD28 and CTLA-4 on antigen presenting cells, results in changes in cytokine production.¹⁶ Furthermore, it was demonstrated a higher expression of the CCR5 receptor connected to the cytokine that has the same name (CCR5). This lead to a higher production of interferon gamma, with increased activation of lymphocytes in the site of inflammation.^{16,17}

Another possible mechanism is based on the increased number of cells expressing the marker Fas (CD95) positive. It is from the family of tumor necrosis factors and participates at the induction of programmed cell death through its ligand FasL (CD95L), what indirectly controls the number of active lymphocytes.¹² Ogawa *et al*¹⁸ found that patients with AIH have an increased number of cells positive for Fas with higher conversion of inactive lymphocytes (CD45RO⁻) to active T cells (CD45RO⁺), suggesting a constant and chronic activation of T lymphocytes. CD4⁺CD95⁺ T cells are responsible for the continuous activation of the regulatory system.¹⁸ Although, more studies are still needed to assess the relationship between the immune markers and diagnosis, treatment or prognosis of AIH.

The purpose of this study was to characterize immunophenotypic findings of lymphocytes and monocytes, including HLA-DR, from samples with AIH, AIH associated with cholangitis and controls trying to associate with clinical characteristics and outcome.

Patients and Methods

Patients

This is a prospective study of a cross-sectional cohort of 20 children and adolescents diagnosed with AIH type 1 and 19 with AIH type 1 overlap syndrome with autoimmune cholangitis. Patients were followed at Hepatology Reference Center of Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais between January 1986 and January 2014. All children and adolescents up to 18 years of age at diagnosis, with an adequate follow-up and adherence to treatment, who agreed to participate, were enrolled. It was also assessed a group of 15 healthy control patients, with ages ranging from 10 to 17 years old, which were considered healthy in routine medical evaluation and had no family history of autoimmune diseases.

The study was approved by the National Ethical Clearance Committee of Brazil as well as Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC number 0419.0.203.000-10) and abide by the Helsinki Declaration on human subject research. The consent form was read and signed by researchers and patients.

The diagnosis of AIH was established according to the criteria of the International Group for the Study of AIH, published in 1993 and revised in 1999 and 2008.^{1,2} The diagnosis of overlap syndrome was based on the presence of abnormalities in the biliary tract, such as stenosis and/or dilatation of the intra- and/or extra-hepatic ducts on magnetic resonance imaging (MRI) of biliary tract realized in all patients that presented persistently elevated levels of gamma glutamyl transferase (GGT) and/or poor response to immunosuppressive treatment. Three different experienced hepatologists and two radiologists reviewed the biliary tract images. Histology on liver biopsy was also assessed.

Clinical and Laboratory monitoring

The clinical follow-up consists on clinical and laboratory evaluations at each 1-6 months, according to the protocol and treatment demands. All patients were classified according to the type of AIH (type 1, in the case of ANA and/or positive AML and type 2, when the anti-LKM1 was positive) and the severity of AIH or AIH associated with autoimmune cholangitis (overlap syndrome).

The laboratory findings consist on: complete blood count, prothrombin reaction time, prothrombin activity and determination of the activated partial thromboplastin time; serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl transferase (GGT); dosages of serum bilirubin and plasma proteins with electrophoretic fractionation to assess the liver function of the patient. All other liver diseases were tested and excluded, such as infectious hepatitis, Wilson's disease and deficiency of alpha-1-antitrypsin. All patients performed liver biopsy for disease staging. Overlap with cholangitis was confirmed with magnetic resonance of hepatic biliary tract and histological findings.

Immunophenotyping

Sample of approximately 10 mL of peripheral venous blood was collected from each participant in the three groups to study the profiles of surface markers related to inflammatory process in lymphocytes and monocytes.

Flow cytometry analysis for description of the lymphocyte and monocyte surface marker profile was performed as described by Torres *et al.*¹⁹ The mononuclear cells were obtained from peripheral blood using Ficoll gradient (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Cells were stained using fluorochrome for the markers to be analyzed. Samples were acquired in flow cytometer (BD FACSCanto II[®], California, USA) and analyzed by FlowJo software 7.5[®] (FlowJo Co., Ashland, OR, USA). The percentages of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and of CD14⁺ monocytes were evaluated and also their percentage of expression of different surface markers. Surface markers analyzed were: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CD25, CD95, CD95L, CCR3, CCR5, CD80.

Treatment response assessment

The combined treatment consists on prednisone and azathioprine, taken in daily doses from 1 to 2 mg/kg/day (maximum 60 mg day) and 1.5 mg/kg/day (maximum 100 mg/day), respectively.^{4,5} The first follow up happens in four weeks when the dose of prednisone is reduced by one third of the initial dose and then every two weeks, the dose is decreased conform clinical protocol until reach 5 mg. The dose of 5 mg was maintained if there is a clinical and laboratory remission. Azathioprine is maintained at the initial dose. For patients presenting with leukopenia (leukocyte overall lower than 3,000) and/or thrombocytopenia (less than 50,000) is started only prednisone, azathioprine being added after improvement of such parameters; otherwise maintained only prednisone. The treatment response was evaluated according to the criteria of the International Group for the Study of AIH.¹

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 17[®] (IBM Co., New York, USA) program. The descriptive analysis, using mean, median, standard deviation, interquartile range from 25 to 75th (IQ) and percentages were used to characterize the study group. Chi-square test was used to compare categorical variables.

Immunophenotyping data that is, percentages of expression of markers, was evaluated by nonparametric analysis using the GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) software 5.03[®], as there was no normal distribution evaluated with Shapiro-Wilk test. Comparison of groups was performed using the Kruskal-Wallis statistical test and also using the Mann-Whitney test. The multiple

comparison test of Dunn was used to compare the pairs in groups. In all analyzes, differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Confidence interval was calculated for the comparisons between groups.

The total number of patients in each analysis for different markers ranged 3-20 in AIH and overlap syndrome groups and 9-15 in the control group due to experimental problems that caused losses of samples. These losses are inherent to the experimental method used.

Results

Patient's description

The characteristics of the patients are presented in Table 1.

Table 1 - Comparison of the main clinical, laboratory and evolution features of two groups of patients with AIH and AIH in association with autoimmune cholangitis (overlap syndrome).

	Autoimmune hepatitis (n=20 patients)	Autoimmune hepatitis associated with autoimmune cholangitis (n=19 patients)	Statistical significance (p value)
Median (IQ 25-75th) of age at clinical onset (years)	10.7 (7.2-12.7)	10.2 (7.6-11.2)	0.90
Median (IQ25-75th) of age at the time of evaluation	15 (13.5-20.5)	15 (12.3-18)	1.00
Gender (females n)	13 (65%)	10 (52.6%)	0.52
Median (IQ 25-75th) of follow-up time (months)	78 (29-143)	38.5 (24-73.3)	0.14
Median (IQ 25-75th) of time into remission (months)	48 (24-96)	24 (24-48)	0.13
Forms of presentation (number of patients)			
<i>Acute onset</i>	9 (45%)	4 (21%)	0.18
<i>Chronic liver disease</i>	7 (35%)	6 (31.6%)	1.00
<i>Hepatic failure</i>	2 (10%)	3 (15,8%)	0.66
<i>Fortuitous finding</i>	2 (10%)	4 (21%)	0.41
<i>Other forms</i>	0 (0%)	2 (10.5%)	0.23

	Autoimmune hepatitis (<i>n</i> =20 patients)	Autoimmune hepatitis associated with autoimmune cholangitis (<i>n</i> =19 patients)	Statistical significance (<i>p</i> value)
Autoantibodies positivity			
<i>ASMA</i>	14 (70%)	15 (78.9%)	0.72
<i>ANA</i>	9 (45%)	14 (73.7%)	0.10
Laboratory findings at first consultation (median and IQ range)			
<i>AST</i> *	12.3 (2.4 to 17.0)	11.4 (5.6 to 27.0)	0.88
<i>ALT</i> *	11.8 (4.6 to 20.0)	7.3 (3.2 to 22.0)	0.59
<i>GGT</i> *	2.5 (1.7 to 4.4)	4.2 (2.6 to 6.4)	0.02
<i>Albumin</i>	3.5 (3.3 to 4.0) g/dL	3.6 (3.2 to 3.9) g/dL	0.90
<i>Gammaglobulinemia</i>	2.3 (1.3 to 2.8) g/dL	3.2 (2.2 to 4.1) g/dL	0.04
<i>Prothrombin activity</i>	75 (54 to 87) %	59 (42 to 74) %	0.24
Response to treatment			
<i>Complete response</i>	20	19	0.99
<i>Deaths</i>	0	0	-

*AST, ALT and GGT results are show as mean of numbers of times the upper reference value (RV)

In the first histopathological evaluation, 9 patients (45%) in AIH group and 10 (52.6%) patients in overlap syndrome group have presented findings compatible with cirrhosis. There was no statistically significant difference for this data for the two groups ($p=0.87$). In overlap syndrome group, 2 (10.5%) patients also presented with inflammatory bowel disease and received adequate treatment.

The control group had a median age of 14.5 (IQ25-75th of 12.8 to 17) and there was no statistically significant difference between the median age of patients in the control group and the groups of patients with AIH ($p =0.36$) and overlap syndrome ($p=0.73$).

Immunophenotyping results

At this stage of the study, it was performed immunophenotypic evaluation of lymphocytes and monocytes of patients and the control group. Due to technical problems with the cytometry process (loss of samples during preparation or reading) the number of patients in each group was variable for each marker.

The total white blood cell counts of AIH patients ranged from 2360 to 11220 with median of 5750 (IQ25-75th of 4348 to 8090) and of overlap syndrome group ranged from 2130 to 15280 with median of 5400 (IQ25-75th of 3400 to 6320). The

lymphocyte count of AIH patients ranged from 590 to 5990 with median of 1755 (IQ25-75th of 978 to 4008) and of overlap syndrome group ranged 610 to 4588 with median of 1370 (IQ25-75th of 950 to 2690). The monocyte count in AIH group ranged from 84 to 620 with median of 309 (IQ25-75th of 168 to 537) and of overlap syndrome group ranged from 108 to 1740 with median of 450 (IQ25-75th of 280 to 570).

There was a statistically significant difference between the patient groups (AIH and overlap syndrome) and the control group with respect to total white blood cell count with $p=0.046$ and $p=0.003$, respectively, being that the groups of patients had lower counts. However, there was no statistically significant difference between the AIH group and control group in lymphocyte count ($p=0.080$) and monocyte count ($p=0.395$). On the other hand, among the overlap syndrome and control groups there was a statistically significant difference in lymphocyte count ($p=0.037$), but the same was not true for monocytes ($p=0.368$).

The first evaluation performed was the total number of T CD4⁺, T CD8⁺ and CD14⁺ cells. About CD4⁺ T cells there was significant difference between the AIH and control groups ($p=0.0009$); and AIH overlap with cholangitis and controls ($p=0.025$), the patients have a greater number of these cells, as show in Figure 1. Confidence interval of these comparisons are shown in Tables 2, 3 and 4.

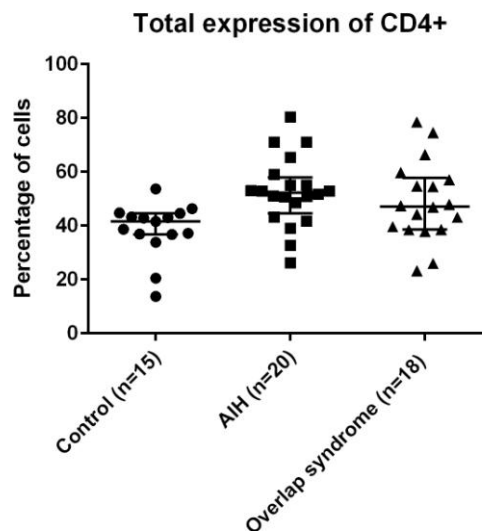


Figure 1: Percentage total of CD4⁺ T cells in PBMC with representation of median and interquartile range 25-75th.

There was no statistically significant difference between groups with respect to the percentage of T CD8⁺ cells ($p=0.314$ and $p=0.630$, respectively) as shown in

Figure 2. On the other hand, on the assessment of CD14⁺ cells (monocytes), only the AIH group had a reduced percentage of cells compared to the control group ($p = 0.004$) as shown in Figure 3.

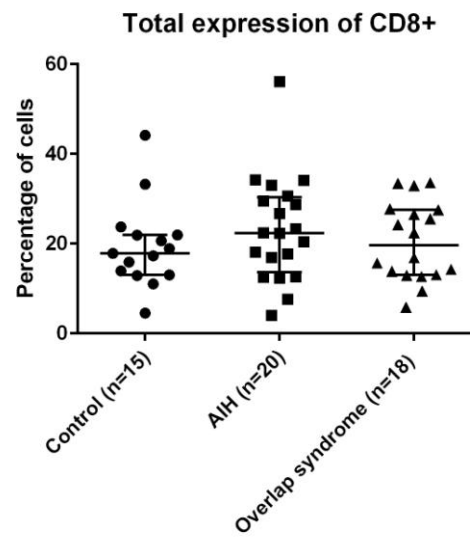


Figure 2: Percentage total of CD8⁺ T cells in PBMC with representation of median and interquartile range 25-75th.

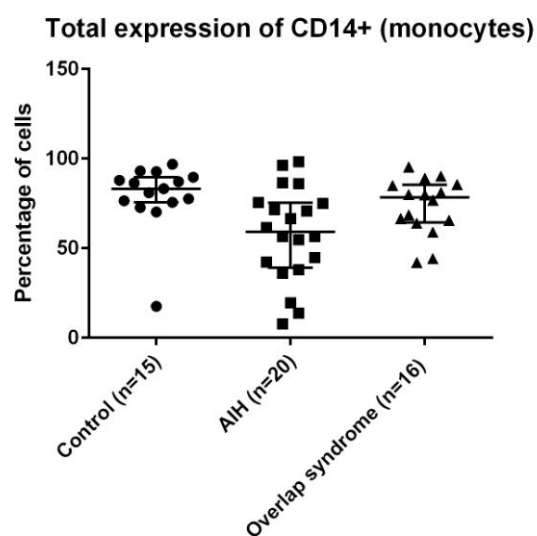


Figure 3: Percentage total of CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC with representation of median and interquartile range 25-75th.

After this initial analysis, we assessed the specific markers. The statistical results for medians, interquartile ranges (25-75th) and difference of medians comparison for expression of the surface markers tested are shown in tables 2, 3 and 4. The p value was considered significant when ≤ 0.05 . A table with the results of means

and standard error of the mean for all the evaluated markers are available as supplemental results (anexo A).

Table 2- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in all groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD4⁺ T cells.

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in AIH group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between AIH and control groups	Median and IQ range in overlap syndrome group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between overlap syndrome and control groups
CCR3 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	1.7 [0.75-2.3] (n=12)	12.7 [2.53-54.2] (n=5)	<i>p</i> =0.003 (0.9 to 5.8)	10.7 [1.8-32.9] (n=8)	<i>p</i> =0.047 (0.1 to 32.9)
CCR5 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	2.0 [1.5-4.8] (n=12)	1.1 [1.0-4.9] (n=3)	<i>p</i> =0.362 (-4.7 to 3.3)	5.1 [1.2-9.3] (n=8)	<i>p</i> =0.214 (-0.9 to 6.2)
CD45RA ⁺ in CD4 ⁺ T cells	18.4 [11.2-27.8] (n=14)	23.7 [15.3-32.4] (n=14)	<i>p</i> =0.250 (-2.9 to 16.2)	29.2 [21.9-39.8] (n=16)	<i>p</i> =0.023 (2.1 to 18.8)
CD45RO ⁺ in CD4 ⁺ T cells	13.8 [8.3-17.4] (n=14)	18.8 [13.6-27.0] (n=15)	<i>p</i> =0.040 (0.1 to 11.6)	12.2 [11.0-18.8] (n=15)	<i>p</i> =0.973 (-5.3 to 5.0)
CD25 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	1.2 [0.7-2.0] (n=14)	1.0 [0.4-2.8] (n=13)	<i>p</i> =0.675 (-0.8 to 0.6)	1.6 [0.9-2.6] (n=15)	<i>p</i> =0.381 (-0.5 to 0.9)
CD28 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	35.9 [34.5-44.8] (n=9)	50.8 [38.6-56.9] (n=19)	<i>p</i> =0.027 (1.3 to 18.4)	45.0 [36.8-54.2] (n=18)	<i>p</i> = 0.092 (-2.1 to 17.4)
CD28 ^{NEG} in CD4 ⁺ T cells	1.5 [0.7-3.2] (n=9)	1.3 [0.8-1.2] (n=19)	<i>p</i> =0.995 (-1.4 to 0.8)	1.6 [2.6-6.5] (n=18)	<i>p</i> = 0.623 (-0.9 to 1.4)
CTLA-4 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	0.5 [0.4-0.9] (n=14)	0.4 [0.3-0.7] (n=15)	<i>p</i> =0.585 (-0.3 to 0.2)	0.7 [0.3-3.0] (n=14)	<i>p</i> =0.421 (-0.2 to 1.1)
CD95 ⁺ (Fas) in CD4 ⁺ T cells	15.0 [11.0-17.0] (n=15)	14.9 [12.5-22.0] (n=16)	<i>p</i> =0.440 (-2.9 to 6.7)	11.9 [10.3-20.0] (n=13)	<i>p</i> =0.865 (-5.0 to 4.9)

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (<i>n</i> of patients)	Median and IQ range in AIH group (<i>n</i> of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between AIH and control groups	Median and IQ range in overlap syndrome group (<i>n</i> of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between overlap syndrome and control groups
CD95L ⁺ (FasL) in CD4 ⁺ T cells	0.3 [0.2-0.8] (<i>n</i> =15)	0.6 [0.3-0.7] (<i>n</i> =11)	<i>p</i> =0.184 (-0.1 to 0.5)	0.7 [0.3-1.3] (<i>n</i> =12)	<i>p</i> =0.142 (-0.1 to 1.0)
CD69 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	0.7 [0.3-1.2] (<i>n</i> =14)	0.2 [0.2-0.7] (<i>n</i> =16)	<i>p</i> =0.150 (-0.8 to 0.06)	0.5 [0.2-2.7] (<i>n</i> =14)	<i>p</i> =0.828 (-0.5 to 1.0)
CD40L ⁺ in CD4 ⁺ T cells	0.2 [0.1-0.6] (<i>n</i> =14)	0.4 [0.2-0.9] (<i>n</i> =16)	<i>p</i> =0.429 (-0.1 to 0.4)	0.3 [0.2-2.1] (<i>n</i> =13)	<i>p</i> =0.112 (-0.05 to 1.4)
HLA-DR ⁺ in CD4 ⁺ T cells	1.3 [1.2-2.1] (<i>n</i> =9)	1.5 [1.2-3.5] (<i>n</i> =15)	<i>p</i> = 0.881 (-0.7 to 1.9)	2.3 [1.0-5.9] (<i>n</i> =14)	<i>p</i> =0.256 (-0.4 to 4.2)
CD4 total em PBMC*	41.7 [36.7-44.5] (<i>n</i> =15)	52.3 [44.5-58.0] (<i>n</i> =20)	<i>p</i> =0.0009 (6.5 to 19.1)	47.2 [38.5-57.7] (<i>n</i> =18)	<i>p</i> =0.025 (1.0 to 18.1)

*PBMC: peripheral blood mononuclear cells

Table 3- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in all groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD8⁺ T cells.

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in AIH group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between AIH and control groups	Median and IQ range in overlap syndrome group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between overlap syndrome and control groups
CCR3 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.6 [0.3-0.9] (n=12)	1.2 [0.5-2.9] (n=8)	<i>p</i> =0.044 (0.01 to 2.5)	1.2 [0.8-1.8] (n=10)	<i>p</i> =0.001 (0.4 to 1.9)
CCR5 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	1.2 [0.8-2.2] (n=12)	0.9 [0.3-2.0] (n=8)	<i>p</i> =0.296 (-1.6 to 0.6)	1.5 [0.4-3.5] (n=10)	<i>p</i> =0.859 (-0.9 to 1.1)
CD45RA ⁺ in CD8 ⁺ T cells	14.4 [9.5-18.4] (n=13)	18.2 [15.1-24.7] (n=4)	<i>p</i> =0.157 (-2.7 to 13.4)	24.1 [16.7-28.2] (n=10)	<i>p</i> =0.017 (2.5 to 15.6)
CD45RO ⁺ in CD8 ⁺ T cells	4.7 [2.8-12.2] (n=14)	2.4 [1.5-4.5] (n=16)	<i>p</i> = 0.063 (-5.6 to 0.2)	1.8 [1.0-3.1] (n=13)	<i>p</i> =0.0056 (-7.3 to -0.5)
CD25 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.3 [0.2-0.4] (n=13)	0.2 [0.1-0.8] (n=11)	<i>p</i> =0.597 (-0.2 to 0.4)	0.5 [0.2-0.9] (n=15)	<i>p</i> =0.044 (0.01 to 0.3)
CD28 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	15.3 [11.4-22.4] (n=13)	15.9 [10,0-24.8] (n=17)	<i>p</i> =0.995 (-7.7 to 7.4)	11.3 [9.3-23.5] (n=15)	<i>p</i> =0.404 (-9.7 to 2.1)
CD28 ^{NEG} in CD8 ⁺ T cells	3.6 [1.9-6.5] (n=13)	3.5 [1.7-6.2] (n=17)	<i>p</i> =0.958 (-2.5 to 2.3)	3.4 [2.2-4.4] (n=15)	<i>p</i> =0.871 (-2.3 to 1.4)
CTLA-4 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.3 [0.2-0.6] (n=14)	0.2 [0.1-0.5] (n=19)	<i>p</i> =0.474 (-0.2 to 0.2)	0.4 [0.1-0.8] (n=17)	<i>p</i> =0.524 (-0.1 to 0.5)
CD95 ⁺ (Fas) in CD8 ⁺ T cells	4.6 [3.5-6.3] (n=14)	3.2 [2.0-5.6] (n=10)	<i>p</i> =0.483 (-3.4 to 2.3)	4.2 [1.0-6.6] (n=12)	<i>p</i> =0.764 (-2.1 to 5.9)

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in AIH group (n of patients)	p value and confidence interval for difference between AIH and control groups	Median and IQ range in overlap syndrome group (n of patients)	p value and confidence interval for difference between overlap syndrome and control groups
CD95L ⁺ (FasL) in CD8 ⁺ T cells	0.3 [0.1-0.9] (n=15)	0.3 [0.2-0.6] (n=18)	p=0.851 (-0.5 to 0.2)	0.3 [0.1-1.2] (n=16)	p=0.792 (-0.1 to 0.8)
CD69 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.5 [0.3-0.7] (n=12)	0.7 [0.2-1.2] (n=12)	p=0.599 (-0.3 to 0.7)	0.5 [0.3-1.5] (n=15)	p=0.782 (-0.2 to 0.8)
CD40L ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.2 [0.1-0.4] (n=13)	0.2 [0.1-0.4] (n=18)	p=0.729 (-0.2 to 0.2)	0.3 [0.1-1.0] (n=15)	p=0.132 (-0.1 to 0.5)
HLA-DR ⁺ in CD8 ⁺ T cells	2.0 [1.1-5.6] (n=12)	1.4 [0.6-2.4] (n=12)	p=0.126 (-3.8 to 0.2)	1.7 [0.8-5.7] (n=15)	p=0.692 (-1.9 to 2.3)
CD8 total em PBMC*	17.8 [13.0-21.9] (n=15)	22.3 [13.6-30.3] (n=20)	p=0.314 (-3.4 to 10.8)	19.6 [13.0-27.5] (n=18)	p=0.630 (-5.1 to 9.2)

*PBMC: peripheral blood mononuclear cells

Table 4- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in all groups with total number of patients in each evaluation; p value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD14⁺ cells (monocytes).

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in AIH group (n of patients)	p value and confidence interval for difference between AIH and control groups	Median and IQ range in overlap syndrome group (n of patients)	p value and confidence interval for difference between overlap syndrome and control groups
CD80 ⁺ in CD14 ⁺ cells	1.4 [0.3-2.8] (n=15)	1.4 [0.7-1.9] (n=20)	p=0.863 (-0.8 to 0.8)	1.8 [1.2-4.0] (n=15)	p=0.068 (-0.2 to 2.3)

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in AIH group (n of patients)	p value and confidence interval for difference between AIH and control groups	Median and IQ range in overlap syndrome group (n of patients)	p value and confidence interval for difference between overlap syndrome and control groups
HLA-DR ⁺ in CD14 ⁺ cells	83.5 [74.5-89.2] (n=15)	33.5 [16.2-58.6] (n=19)	p=0.0001 (-59.3 to -25.5)	53.6 [32.9-81.7] (n=15)	p=0.029 (-46.5 to -2.0)
CD14 total em PBMC*	83.2 [75.6-89.6] (n=15)	59.5 [39.1-75.3] (n=20)	p=0.004 (-36.5 to -5.9)	78.3 [64.3-85.4] (n=18)	p=0.163 (-17.4 to 3.1)

*PBMC: peripheral blood mononuclear cells

The results of the markers that showed statistically significant differences are also presented in graphs in Figures 4, 5, 6 and 7. The graphs bars shows median with interquartile range (25-75th) of percentage of cells.

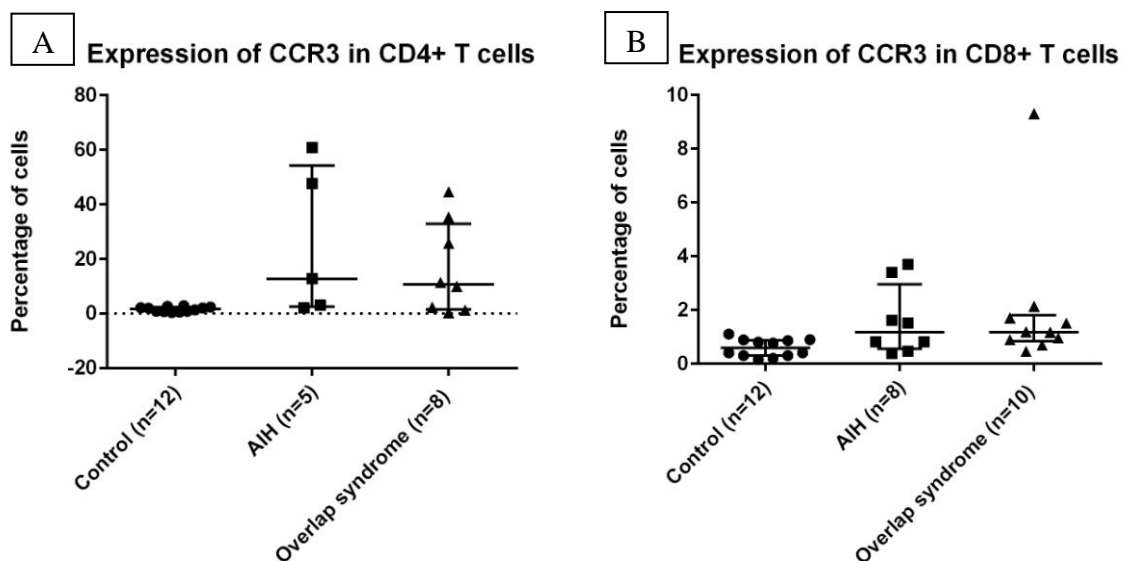


Figure 4- 4.A: Expression of CCR3 in CD4⁺ T cells in PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation. 4.B: Expression of CCR3 in CD8⁺ T cells in PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation.

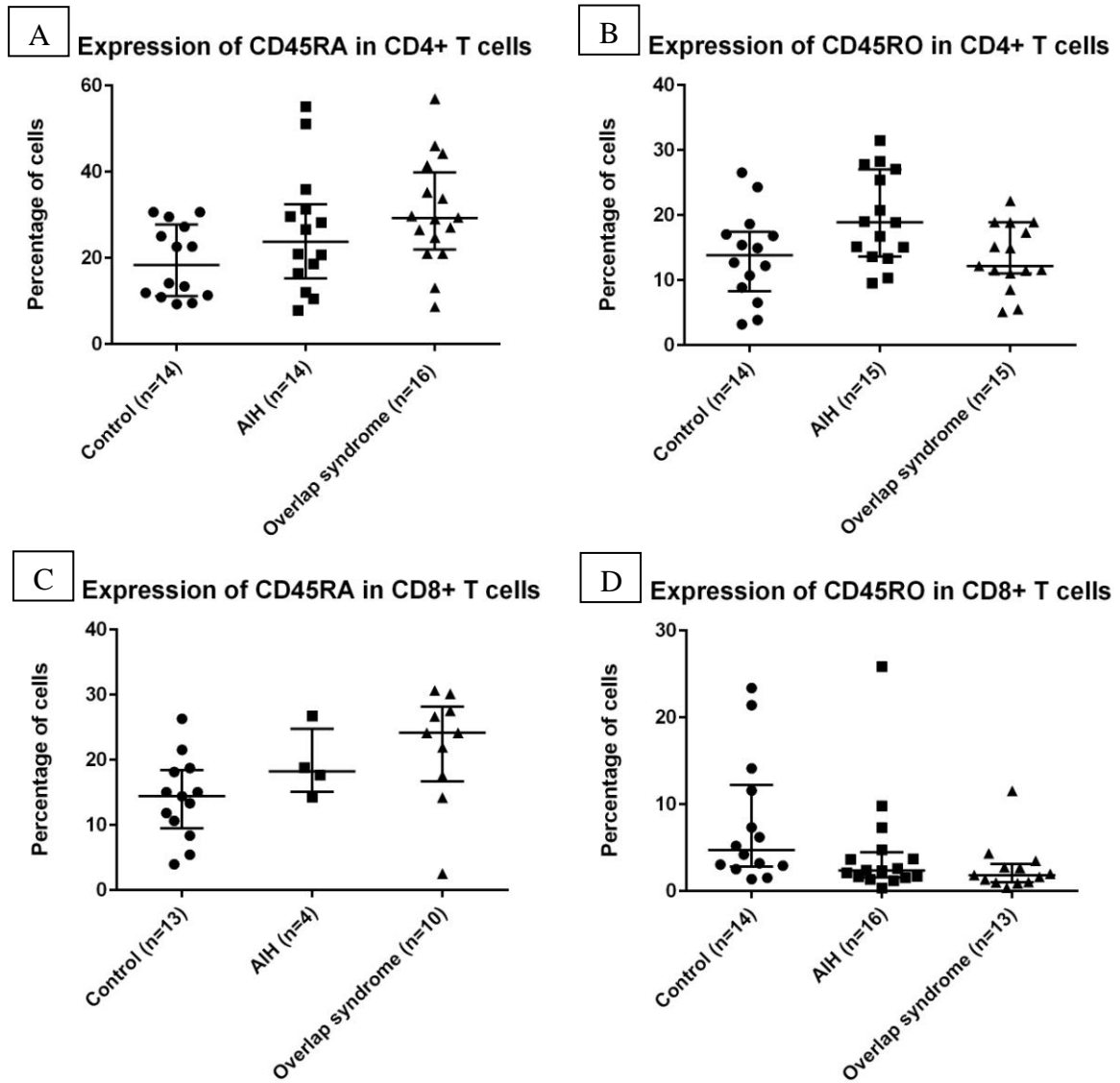


Figure 5- Expression of CD45RA and CD45RO in T cells of PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation. 5.A: Expression of CD45RA in CD4⁺ T cells. 5.B: Expression of CD45RO in CD4⁺ T cells. 5.C: Expression of CD45RA in CD8⁺ T cells. 5.D: Expression of CD45RO in CD8⁺ T cells.

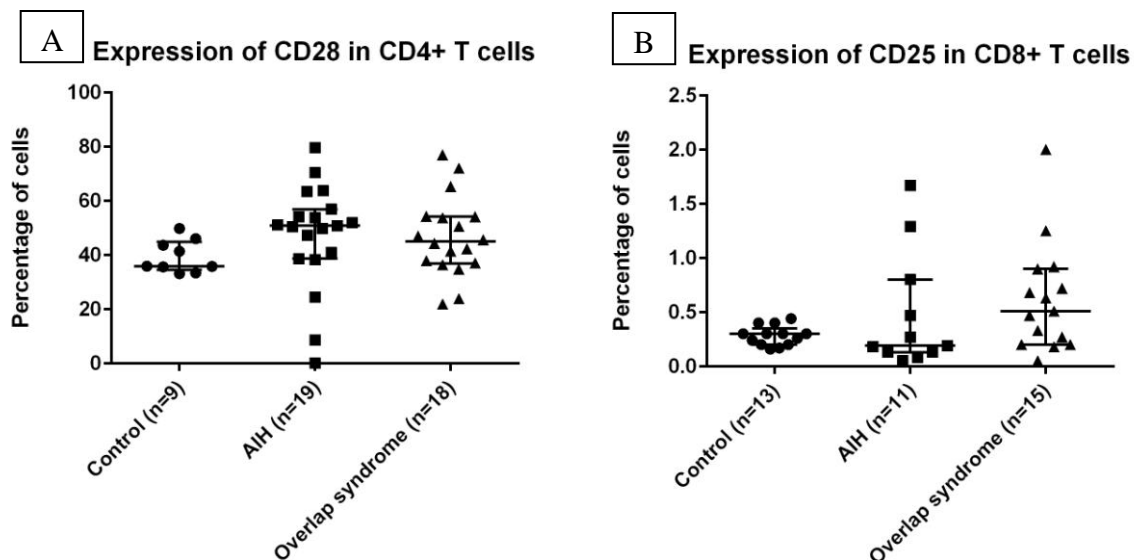


Figure 6: Expression of CD28 and CD25 in T cells in PBMC of patients and controls with median and interquartile range 25-75th representation. 6.A: Expression of CD28 in CD4⁺ T cells in PBMC. 6.B: Expression of CD25 in CD8⁺ T cells in PBMC.

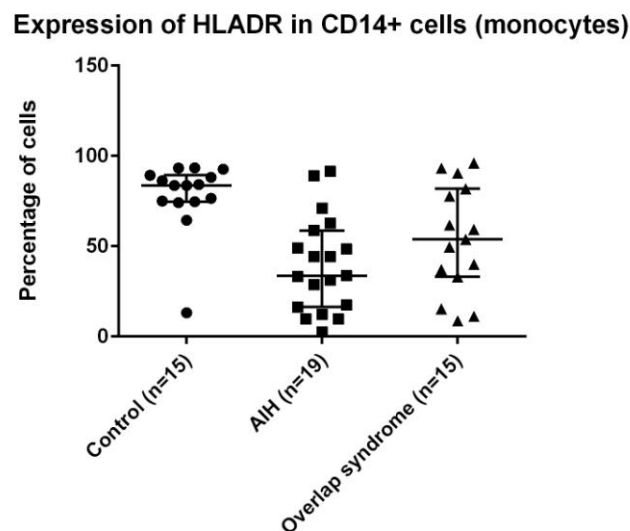


Figure 7: Expression of HLA-DR in CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC with median and interquartile range 25-75th representation.

Discussion

First, both groups have similar clinical and laboratory characteristics to those described in other samples of AIH patients.^{6,20-27} Adolescents and females were the most prevalent and the most common presentation forms were acute onset and chronic liver disease findings. Autoantibodies ASMA and ANA were more prevalent, confirming that type 1 AIH is the most frequent as observed in other studies.^{6, 20-27} On first histopathological evaluation, cirrhosis was present in more than 50% of patients in

most other studies, ranging from 20 to 75%.^{6,20,22-27} The difference observed in total leukocyte counting's, with patients presenting lower number of cells, are probably result of the hypersplenism that patients with chronic liver disease may have due to hepatic fibrosis and/or cirrhosis.^{3,4}

Evaluating the general characteristics of the groups of patients it was shown that there was no statistically significant difference in the clinical laboratory variables, except for GGT and gamma globulin levels. The difference in GGT was expected, considering that the overlap syndrome group presents a bile duct disease. Often, the persistent increase in GGT is what justifies the investigation of the presence of associated cholangitis, although not pathognomonic of this. Other studies have shown the importance of this finding.^{6,8,21,24,26,27} On the other hand, the highest gamma globulinemia observed in the same group was not found in other samples.

Immunophenotyping findings

Although patients had lower leucocytes count's, they presented higher percentages of CD4⁺ T cells when compared to controls, possible meaning that these cells play a key role in the pathophysiology of AIH. Other studies already showed the participation of these cells in immune response of AIH.^{13-15,28-30} In AIH patients group we also observe a decreased percentage of CD14⁺ T cells compared to the control group. This finding is opposite to that reported by Longhi *et al*³¹ in children and young adults diagnosed with AIH, even without clinical and laboratory disease activity. They showed an increase in the number and activity of monocytes, with impairment of immune regulatory mechanisms. We believe that more studies are needed to evaluate the findings related to monocytes considering the opposite findings encountered.

Human chemokine receptor CCR3 (hCCR3) belongs to the G protein coupled receptors (GPCRs) superfamily of membrane proteins and promotes pro-inflammatory conditions associated with release of reactive oxygen species. hCCR3 is more common in basophils and eosinophils, besides being also found in lymphocytes. Autoimmune conditions such as atopic dermatitis, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis courses with higher expression of this receptor.³²⁻³³ Landi *et al*³⁵ showed that eotaxin-3 (CCL26) produced in the vascular endothelium, which recruits' eosinophils to sites of inflammation and binds to CCR3, is significantly increased in the serum of patients with autoimmune liver disease compared to normal individuals or patients with chronic hepatitis C. Also, high expression of CCR3 in peripheral T

lymphocytes were observed in adult individuals with ulcerative colitis (UC) when compared to Crohn's disease and controls.³⁶ In our study, CD8⁺ and CD4⁺ have higher expression of hCCR3 than controls in comparisons with AIH or AIH with overlap syndrome. Further research might enlighten this finding, considering the existence of possible pathway antagonists of this receptor that could be potential targets for a treatment for AIH with or without overlap syndrome.³⁷

The CD45 surface marker was evaluated as CD45RA⁺ for naive T cells (unstimulated) and as CD45RO⁺ a memory T cell marker. In terms of CD4⁺ T lymphocytes, CD45RA⁺ have an increasingly expression in AIH and even higher in overlap syndrome. While CD45RO⁺ was increased only on AIH population with the overlap syndrome being quite similar to the control. This finding is suggestive of a chronic and persistent activation of lymphocytes already described in AIH.¹⁸ In both AIH with or without overlap syndrome we have a continuous activation of the regulatory system. In CD8⁺ T cells, the CD45RA⁺ was highly expressed in overlap syndrome and CD45RO⁺ were decreased in the same population of AIH, suggesting a memory activation on AIH associated with overlap syndrome but not in isolated AIH in our patients.

CD28 ligation is considered the major co-stimulatory signal for activation of naive T cells, this co-stimulation via CD28 promotes T cell viability and expansion, cytokine production and regulates long-term T cell survival.³⁸ Some authors understand that CD28⁺/CD28⁻ among CD8⁺ T cells reflects replicative senescence and might mean immune exhaustion.³⁹ When compared with CD28⁺ T cells, activated CD28⁻ T cells produce high levels of interferon γ and TNF α , inducing up-regulation of intercellular cell adhesion molecule-1, working as a enhancer of inflammation.⁴⁰ Kurokohchi *et al*⁴¹ analyzed the expression levels of CD28 protein on PBMC and in liver tissue from AIH adult patients and its correlation with the degree of hepatocellular damage. Their analysis revealed that numbers of CD28⁺CD4⁺ T cells in PBMC were significantly reduced in patients without corticosteroids treatment while in treated patients the numbers were comparable to the control individuals, maybe it meaning treatment response. By contrast, CD28⁺CD8⁺ T cells in PBMC were decreased in both treated and untreated patients. They also founded that numbers of CD28⁻CD4⁺ T cells in PBMC and CD28⁻CD8⁺ T cells in PBMC were comparable between AIH patients and controls.

In our study we identify an increased expression of CD28 in CD4⁺ T cells of AIH patients with statistical significant difference and an increased expression in overlap syndrome patients, but without significant difference when compared to controls. We hypothesized that this finding may be due to differences in the ages of the patients evaluated in our study compared to those assessed in Kurokochi *et al*⁴¹ study. Perhaps children and adolescents may present a more evident response to treatment with corticosteroids, leading to the increase of CD4⁺CD28⁺ T cells, but more studies are needed to confirm and understand this finding. On the other hand, similarly to Kurokochi *et al*⁴¹ finding, CD28⁻CD4⁺ and CD28⁻CD8⁺ T cells percentages in PBMC were comparable between our AIH patients and controls.

The surface marker CD25 is a component of the IL-2 receptor and has been implicated as an important regulator of T cell proliferation, activation of induced cell death, as well as the actions of both regulatory (Treg) and effector (Teff) T cells.⁴² The CD25 locus is associated with many autoimmune diseases in genome wide association studies.^{28,42} Longhi *et al*^{13,28} had described an impairment in number and function of regulatory T cells in autoimmune liver disease. Also, using a more specific profile for Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺), the studies of Peiseler *et al*²⁹ and Liberal *et al*⁴³ showed opposite results. The first demonstrated a higher frequency of Treg cells in AIH patients with active disease and the second showed numerically and functionally impairment of Treg cells in autoimmune liver disease patients.

In our patients, CD25⁺ were more expressed in CD8⁺ T lymphocytes in AIH and in overlap syndrome, considering that this last group presented a result with statistical significant difference when compared to controls. We believe that, in view of what has already been described for CD4⁺ T cells in the literature and considering our findings, this marker has a major role in the pathophysiology of AIH. The exact meaning of this higher expression in CD8⁺ T cells must to be addressed.

Finally, at monocytes we evaluate the expression of HLA-DR. HLA-DR haplotypes has been already described as susceptibility factors for AIH even in children, but few studies evaluated its surface cell expression.^{9-12,44,45} In our patients, HLA-DR was less expressed in AIH with or without overlap syndrome being the expression in AIH even lower when compared to the overlap syndrome group. Longhi *et al*³¹ reported the same result when assessing children and young adults diagnosed with autoimmune hepatitis. Hiasa *et al*⁴⁶ also showed a similar finding in dendritic cells of adult patients

with AIH and primary biliary cirrhosis. We, like them, believe that this finding may represent that a defective phenotype may have a relevance to the breakdown of tolerance to self-antigen in these autoimmune diseases, considering that the low expression of HLA-DR may hinder the full access and function of suppressor T cell.

We describe a complex phenotypic characterization that may be involved in the pathophysiology of AIH, with participation of changes in the immune system regulatory mechanisms represented by cell surface markers. The main findings were related to CCR3, CD45RA/RO, CD25 in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and HLA-DR in monocytes as markers of disease activity with persistent inflammatory findings. Put all together, this data is quite interesting if we consider that the patients are in use of immunosuppressant (corticotherapy with or without azathioprine) and, even with good clinical and laboratory response by the currently existing criteria, they still have signs of immune activity and autoimmunity at cellular level.

REFERENCES

1. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cançado EL, *et al.* International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938.
2. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children: what is different from adult AIH? *Semin Liver Dis* 2009; 29: 297-306. [PMID: 19676002 DOI: 10.1055/s-0029-1233529]
3. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, *et al.* Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 158-164. [PMID: 19561543 DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181a1c265]
4. Ferreira AR, Roquete ML, Toppa NH, de Castro LP, Fagundes ED, Penna FJ. Effect of treatment of hepatic histopathology in children and adolescents with autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 65-70. [PMID:18162836]
5. Bogdanos DP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoantibodies and their antigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2009; 29: 241-253. [PMID:19675997 DOI: 10.1055/s-0029-1233533]

6. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, *et al.* Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997;25(3):541–547. [PMID: 9049195]
7. Abdalian R, Dhar P, Jhaveri K, Haider M, Guindi M, Heathcote EJ. Prevalence of sclerosing cholangitis in adults with autoimmune hepatitis: evaluating the role of routine magnetic resonance imaging. *Hepatology* 2008; 47(3):949-57. [PMID: 18200555 DOI: 10.1002/hep.22073]
8. Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, *et al.* Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001; 33(3):544-53. [PMID: 11230733]
9. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, *et al.* Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: Evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999; 30:1374-1380. [PMID: 10573514]
10. Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM, McFarlane IG, Johnson PJ, Williams R. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens HLA-DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* 1991; 13:701-706. [PMID: 2010165]
11. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cançado ELR, Porta G, Goldberg AC, *et al.* Clinical distinctions and pathogenic implications of type I autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002; 37:302-308. [PMID: 12175624]
12. Liu PMF, Miranda DM, Fagundes EDT, Ferreira AR, Silva ACS. Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors. *World J Gastroenterol* 2013 July 28; 19(28): 4455-4463. [PMID: 23901220 DOI: 10.3748/wjg.v19.i28.4455]
13. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al.* Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176: 4484-4491 [PMID: 16547287]
14. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67. [PMID: 11722623 DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820104.x]
15. Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, *et al.* A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1

- autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 52: 999-1007. [PMID: 20683931 DOI: 10.1002/hep.23792]
16. Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, *et al.* Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2523-2529. [PMID: 16688797]
 17. Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344-345. [PMID: 9450746 DOI: 10.1038/34814]
 18. Ogawa S, Sakaguchi K, Takaki A, Shiraga K, Sawayama T, Mouri H, *et al.* Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 69-75. [PMID: 10719750 DOI: 10.1046/j.1440-1746.2000.02044.x]
 19. Torres KCL, Antonelli LRV, Souza ALS, Teixeira MM, Dutra WO, Gollob KJ. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. *Journal of Neuroimmunology* 2005; 166:144-157. [PMID: 16026859]
 20. Ferreira AR, Roquete MLV, Penna FJ, Toppa NH. Autoimmune hepatitis in children and adolescents: clinical study, diagnosis and therapeutic response. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78(4): 309-314. [PMID: 14647762]
 21. Brandão MAB, Pinto EALC, De Tommaso AMA, Hessel G. Clinical and Biochemical features of autoimmune hepatitis in 36 pediatric patients. *Arq Gastroenterol* 2006; 43(1): 45-49. [PMID: 16699618]
 22. Vitfell-Pedersen J, Jørgensen MH, Müller K, Heilmann C. Autoimmune hepatitis in children in Eastern Denmark. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55(4):376-9. [PMID: 22644464]
 23. Dehghani SM, Haghghat M, Imanieh MH, Honar N, Negarestani AM, Malekpour A, *et al.* Autoimmune hepatitis in children: experiences in a tertiary center. *Iran J Pediatr* 2013; 23 (3):302-308. [PMID: 23795253]
 24. Rojas CP, Bodicharla R, Campuzano-Zuluaga G, Hernandez L, Rodriguez MM. Autoimmune Hepatitis and Primary Sclerosing Cholangitis in Children and Adolescents. *Fetal and Pediatric Pathology* 2014; 33:202-209. [PMID:24754367 DOI: 10.3109/15513815.2014.898721]

25. Cisneros JN, Rodriguez YJ. Autoimmune hepatitis in children: progression of 20 cases in northern Mexico. *Revista de Gastroenterología de México* 2014; 79(4):238-243. [PMID: 25456212 DOI: 10.1016/j.rgm.2014.08.006]
26. Low JM, Tan M, Garcia A, Aw M, Quak SH. Childhood autoimmune hepatitis in a paediatric unit of a tertiary care hospital. *Singapore Med J* 2014; 55(12):648-651. [PMID: 25630319 DOI: 10.11622/smedj.2014179]
27. Jiménez-Rivera C, Ling SC, Ahmed N, Yap J, Aglipay M, Barrowman N, *et al.* Incidence and Characteristics of Autoimmune Hepatitis. *Pediatrics* 2015; 136(5): e1237-e1247. [PMID: 26482664 DOI:10.1542/peds.2015-0578]
28. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41(1):31-37. [PMID: 15246204]
29. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, *et al.* FOXP3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012; 57(1):125-32. [PMID: 22425700 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.029].
30. Liberal R, Grant CR, Holder BS, Cardone J, Martinez-Llordella M, Ma Y, *et al.* In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology* 2015; 62(3):863-75. [PMID: 25953611 DOI: 10.1002/hep.27884]
31. Longhi MS, Mitry RR, Samyn M, Scalori A, Hussain MJ, Quaglia A, *et al.* Vigorous activation of monocytes in juvenile autoimmune liver disease escapes the control of regulatory T-cells. *Hepatology* 2009; 50(1): 130-142. [PMID: 19437492 DOI: 10.1002/hep.22914]
32. Gaspar K, Kukova G, Bunemann E, Bühren BA, Sonkoly E, *et al.* The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. *J Dermatol Sci* 2013; 71(1): 12-21. [PMID: 23702389 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.011]
33. Freutel S, Gaffal E, Zahn S, Bieber T, Tüting T, Wenzel J. Enhanced CCR5⁺/CCR3⁺ T helper cell ratio in patients with active cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20(12):1300-4. [PMID: 21844117 DOI: 10.1177/0961203311409267].

34. Aloush V, George J, Elkayam O, Wigler I, Oren S, Entin-Meer M, *et al.* Decreased levels of CCR3 in CD4+ lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28(4):462-7. [PMID: 20659406]
35. Landi A, Weismuller TJ, Lankisch TO, Santer DM, Tyrrell DL, Manns MP, *et al.* Differential serum levels of eosinophilic eotaxins in primary sclerosing cholangitis, primary biliary cirrhosis, and autoimmune hepatitis. *J Interferon Cytokine Res* 2014; 34:204–14. [PMID: 24168449 DOI: 10.1089/jir.2013.0075]
36. Manousou P, Kolios G, Valatas V, Drygiannakis I, Bourikas L, Pyrovolaki K, *et al.* Increased expression of chemokine receptor CCR3 and its ligands in ulcerative colitis: the role of colonic epithelial cells in *in vitro* studies. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(2):337-47. [PMID: 21077277]
37. Pease JE, Horuk R. Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Expert Opin Drug Discov* 2001; 9(5):467-83. [PMID: 24641500 DOI: 10.1517/17460441.2014.897324]
38. Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol* 1993; 11:191-212. [PMID: 8386518]
39. Brzezińska A1, Magalska A, Szybińska A, Sikora E. Proliferation and apoptosis of human CD8(+)CD28(+) and CD8(+)CD28(-) lymphocytes during aging. *Exp Gerontol* 2004;39(4):539-44. [PMID: 15050288]
40. Liaskou E, Jeffery LE, Trivedi PJ, Reynolds GM, Suresh S, Bruns T, *et al.* Loss of CD28 expression by liver-infiltrating T cells contributes to pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2014; 147:221-232. [PMID: 24726754 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.003]
41. Kurokohchi K, Arima K, Masaki T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, *et al.* Analysis of CD28 and bcl-2 expression on peripheral blood and liver-infiltrating mononuclear cells in patients with autoimmune hepatitis. *Clin Immunol* 2006; 26(4):323-330. [PMID: 16779679]
42. Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. *PLoS ONE* 2009; 4(11): e7980. [PMID: 19956753 DOI:10.1371/journal.pone.0007980]
43. Liberal R, Grant CR, Holder BS, Cardone J, Martinez-Llordella M, Ma Y, *et al.* In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in

- low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology* 2015; 62(3):863-75. [PMID: 25953611 DOI: 10.1002/hep.27884]
44. van Gerven NM, de Boer YS, Zwiers A, Verwer BJ, Drenth JP, van Hoek B, *et al.* HLA-DRB1*03:01 and HLA-DRB1*04:01 modify the presentation and outcome in autoimmune hepatitis type-1. *Genes Immun* 2015;16(4):247-52. [PMID: 25611558 DOI: 10.1038/gene.2014.82]
45. Elfaramawy AA, Elhossiny RM, Abbas AA, Aziz HM. HLA-DRB1 as a risk factor in children with autoimmune hepatitis and its relation to hepatitis A infection. *Ital J Pediatr* 2010; 36:73. [PMID: 21067577 DOI: 10.1186/1824-7288-36-73]
46. Hiasa Y, Akbar SM, Abe M, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases; decrease expression of HLA-DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepatol Res* 2002; 22(4): 241-249. [PMID: 11929709]

5.2 Artigo Original 2

Authors: Priscila Menezes Ferri^{1*}, Ana Cristina Simões e Silva^{2,4}, Karen Cecília de Lima Torres⁵, Soraya Luiza Campos Silva³, Diego Junior Queiroga de Aquino³, Eleonora Druve Tavares Fagundes¹, Débora Marques de Miranda², Alexandre Rodrigues Ferreira¹

Priscila Menezes Ferri, MD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: pmferri.liu@gmail.com*

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: acssilva@hotmail.com*

Karen Cecília de Lima Torres, *Researcher of Laboratory of Biomarkers for Diagnosis and Monitoring in René Rachou Research Center, Fiocruz, Minas Gerais, Brazil. E-mail: kcltorres@gmail.com*

Soraya Luiza Campos Silva, *Student of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: sorayalcs@yahoo.com.br*

Diego Junior Queiroga de Aquino. *Student of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: djqaquino@gmail.com*

Eleonora Druve Tavares Fagundes, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: eleonoradruve@uol.com.br*

Débora Marques de Miranda, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: debora.m.miranda@gmail.com*

Alexandre Rodrigues Ferreira, MD, PhD, *Professor of Pediatrics of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. E-mail: alexfer1403@gmail.com*

1. Division of Gastroenterology of Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
2. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular, INCT-MM, CNPq-FAPEMIG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
3. Scientific initiation student of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
4. Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, room #281, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Zip code: 30130-100
5. Laboratory of Biomarkers for Diagnosis and Monitoring, René Rachou Research Center – FIOCRUZ/MG, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Zip code: 30190-002

*corresponding author

Author contributions: Fagundes ED, Miranda DM, Ferreira AR designed the research; Ferri PM, Simões e Silva AC, Torres KCL, Silva SLC and Aquino DJQ performed the

research; Ferri PM, Miranda DM and Ferreira AR wrote the paper; all authors reviewed final version.

Supportive foundations: CAPES, INCT-MM (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573646/2008-2).

Correspondance to: Department of Pediatrics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Priscila Menezes Ferri, Avenida Alfredo Balena 190, 2nd floor, room #264. Zip code: 30130-100, Brazil. **E-mail:** pmferri.liu@gmail.com **Telephone:** +55 0 31 3409-9772 **Fax:** +55 0 31 3409-9772

Title: Primary sclerosing cholangitis: immunophenotypic factors in children and adolescents

Abstract:

Objective: Although the pathogenesis of Primary Sclerosing Cholangitis (PSC) is not fully understood, it is believed that involves a complex interaction between genetic, immunological and environmental factors with breakdown of self-tolerance. Most of the immunophenotype studies in PSC are performed in adults with little description of the findings in pediatric patients. Therefore, the purpose of this article is to assess the cell surface markers findings in a group of pediatric patients with PSC.

Patients and Methods: a case-control study of a cross-sectional cohort of 12 children diagnosed with PSC was realized comparing the immunophenotypic findings to a control group. The diagnosis was suspected according to clinical, laboratory and imaging findings and confirmed with histological findings. Flow cytometry analysis for surface marker profile was performed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and surface markers (clusters of differentiation) analyzed were: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CCR3, CCR5, CD25, CD95, CD95L, CD80, CD86.

Results: Patients had a median age 13.0 years, with prevalence of males (1.4:1) and gamma glutamyl transferase elevation was the most significant laboratory finding in the initial evaluation. Despite reduced lymphocyte count in peripheral blood, patients had a higher percentage of CD4⁺ T cells compared to controls. Significant findings in immunophenotyping for CD4⁺ T cells were higher expression of CCR3, CD25, CD95L, CD40L, HLA-DR and higher percentage of CD28 negative cells. In CD8⁺, CCR3 and CD69 lymphocytes were more expressed. In monocytes, there was increased expression of CD80.

Conclusion: The main findings were related to CD4⁺ T lymphocytes, and they can be considered the most important cells in PSC. The findings related to CTLA-4, CD40L, HLA-DR, CD28 should receive special attention because they are already reported in other studies and have the potential to be treatment targets.

Key-words: Primary sclerosing cholangitis, Genetics, Immunophenotype, Autoimmune disease.

Introduction

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a rare cholestatic liver disease, principally in children, that is characterized by chronic inflammation of the biliary tree, with fibrotic changes resulting in liver fibrosis.^{1,2} Unlike the female predominance of many autoimmune diseases, approximately 2/3 of the PSC patients are male with less than 40 years.³

PSC has a wide-ranging clinical presentation, with asymptomatic patients, unspecific symptoms or patients with chronic liver disease findings.^{4,5} As a result, the diagnosis can be a big challenge, principally at pediatric age. The diagnostic of PSC is based on clinical, laboratory and image findings. The patients present with mild to more severe chronic cholestatic biochemical profile.⁶ The endoscopic retrograde cholangiography is the golden standard imaging method; however, magnetic resonance cholangiography (MRC) has become a good option for PSC diagnosis, being a non-invasive and reliable diagnostic method.^{6,7,8} Serum atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) is the most frequent autoantibody found in PSC.⁹ Other autoantibodies can be positive, but they don't have a good specificity for PSC.^{10,11}

PSC has no effective medical treatment and, in many cases, the disease will progress to cirrhosis and end-stage liver disease with liver transplantation need.^{1,5,12,13} In this context, immunophenotypic findings can be viewed as tools for diagnosis and possible treatment paths. Although the pathogenesis of PSC is not fully understood, it is believed that involves a complex interaction between genetic, immunological and environmental factors with breakdown of self-tolerance.^{14,15} Studies had demonstrated that exists an genetic association with Human Leukocyte Antigen (HLA) from major histocompatibility complex II (MHC II) at chromosome 6p21.^{16,17,18,19,20} Some haplotypes are cited as susceptibility haplotypes, being HLA-DRB1 alleles the most important ones.^{16,17,18,21,22}

Furthermore, there are several hypotheses on immunological mechanisms and pathways that may be altered in the PSC and involved in its pathogenesis. Most of them involving cells of the immune system (lymphocytes, monocytes, natural killer cells and macrophages) and pro-inflammatory cytokines.^{14,23,24,25,26,27} The mechanisms are complex and interact with each other, with no definition until the moment of its importance as propaedeutic and/or therapeutic option. It is also important to mention that most of the immunophenotype studies in PSC are performed in adults with little

description of the findings in pediatric patients. Therefore, the purpose of this article is to assess the immunophenotypic findings in a group of pediatric patients with PSC.

Patients and Methods

Patients

This is a case-control study of a cross-sectional cohort of 12 children diagnosed with PSC. Patients were followed at Hepatology Reference Center of Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais between January 1986 and July 2014. All children and adolescents up to 18 years of age at diagnosis that accepted participate were included.

It was also assessed a group of 15 healthy control patients, with ages ranging from 10 to 17 years old, which were considered healthy in routine medical evaluation and had no family history of autoimmune diseases. This study was approved by the National Ethical Clearance Committee of Brazil as well as local ethical committee (CAAE number 17395313.0.0000.5149) and abide by the Helsinki Declaration on human subject research. The consent form was read and signed by researchers and patients.

The PSC diagnosis was suspected according to clinical, laboratory and imaging findings and was confirmed by the presence of increased canalicular liver enzymes levels associated with characteristic findings in magnetic resonance (MRI) showing strictures of the biliary tract. All patients underwent liver biopsy for disease staging and confirmation. The findings of degeneration of bile duct epithelium, infiltration of portal tracts by mononuclear cells and polymorphonuclear leucocytes, bile ductular proliferation associated with diminution or absence of interlobular bile ducts and periductal concentric fibrosis of small interlobular bile ducts were the histologic features used to confirm PSC.^{1,2}

Clinical and Laboratory monitoring

The clinical follow-up consists on periodic clinical and laboratory evaluations at each 1-6 months, according to the protocol and treatment demands.

The presentation form was considered acute if symptoms such as choloria, fecal acholia, asthenia, fever were associated with laboratory findings; chronic presentation was defined if one of the findings of chronic liver disease, such as hepatosplenomegaly and upper gastrointestinal bleeding were present. The fortuitous finding was considered

when, during routine clinical monitoring, an asymptomatic patient was detected with hepatomegaly or laboratory abnormalities that justified the research of PSC. Finally, in other forms are grouped patients investigated because of other findings as chronic diarrhea.

The initial laboratory testing consists on complete blood count; the prothrombin time, prothrombin activity and determination of the activated partial thromboplastin time; serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl transferase (GGT); dosages of serum bilirubin and plasma proteins with electrophoretic fractionation to assess the liver function of the patient. Other liver diseases were excluded, such as infectious hepatitis, Wilson's disease, deficiency of alpha-1-antitrypsin. None of patients had clinical, laboratorial or histological features suggestive of associated autoimmune hepatitis (AIH Overlap Syndrome). Also, associated diseases as inflammatory bowel disease (IBD) and immunodeficiency are described.

Immunophenotyping

For the evaluation, sample of approximately 10 mL of peripheral venous blood was collected from each participant to study the profiles of surface markers related to inflammatory process in lymphocytes and monocytes and the genetic evaluation of most prevalent HLA subtype. Data collection was performed during routine exams requested to monitor the patient.

Flow cytometry analysis for description of the lymphocyte and monocyte surface marker profile was performed as described by Torres *et al.*²⁸ The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by separating whole blood over Ficoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), stained, and analyzed for their profile. Cells were stained using fluorochrome for the markers to be analyzed. At least 50,000 gated events were acquired for later analysis. Samples were acquired in flow cytometer (BD FACSCanto II[®], Becton, Dickinson Co., California, USA) and analyzed by FlowJo software 7.5[®] (FlowJo Co., Ashland, OR, USA). The percentages of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, and of CD14⁺ monocytes were evaluated and also their expression of different surface markers. Surface markers (clusters of differentiation) analyzed were: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CCR3, CCR5, CD25, CD95, CD95L, CD80, CD86.

Treatment

All patients in this study were in use of ursodeoxycholic acid. None of them was in use of steroids or other immunosuppressive drugs.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 17® program (IBM, New York, USA). The descriptive analysis, using mean, median, standard deviation, interquartile range from 25 to 75 (IQ) and percentages were used to characterize the study group. Chi-square test was used to compare categorical variables.

Immunophenotyping data that is, percentages of expression of markers, was evaluated by nonparametric analysis using the GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) software 5.03®, as there was no normal distribution evaluated with Shapiro-Wilk test. Comparison of groups was performed using Mann-Whitney test (nonparametric ANOVA test). In all analyzes, differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Confidence interval was calculated for the comparisons between groups.

The total number of patients in each analysis for different markers ranged 6-12 in the PSC group and 7-15 in the control group due to experimental problems that caused losses of samples. These losses are inherent to the experimental method used.

Results

Patient's description

The group diagnosed with primary sclerosing cholangitis was composed by 12 patients with a median of current age of 13.0 years and interquartile 25-75th range (IQ 25-75th) of 10.3 to 14.5 years, with 58.3% ($n = 7$) of male patients (1.4:1) and median follow-up period of 55.9 months (IQ from 35,6 to 86 months). The presentation form was of an acute onset in 16.7% of patients ($n=2$), chronic liver disease findings in 33.3% ($n=4$), fortuitous finding in 16.7% ($n=2$) and others forms as isolated abdominal pain or association with other disease in 33.3% patients ($n=4$). Twenty-five percent of patients had positive autoantibodies, being 3 (25%) positive for antinuclear antibody (ANA) and 3 (25%) positive for anti-smooth muscle (ASMA). Four patients (33.3%) presented association with inflammatory bowel disease and two (16.7%) also had immunodeficiency. Fifty percent of the patients were already cirrhotic in the first liver biopsy. One hundred percent of the patients were treating with ursodeoxycholic acid.

Only one patient (8.3%) required a liver transplant and no deaths occurred on the study follow-up period.

The control group consisted of 15 patients in the pediatric age group (seven females and six males) with a median age of 14.5 (IQ range 12.8 to 17) with no significant statistical difference ($p=0.40$), which were considered healthy in routine medical evaluation and had no family history of autoimmune diseases.

Laboratory tests

The laboratory findings in the first evaluation of the patient included liver enzymes aspartate aminotransferase (AST) with median 3.4 times the upper reference value (RV) and IQ range 1.9 to 7.3 times the RV; alanine aminotransferase (ALT) with median 3.0 times the RV and IQ range 2.0 to 5.7 times the RV; gamma glutamyltransferase (GGT) with median 10.2 times the RV and IQ range 5.8 to 21.5 times the RV. Albumin showed median of 3.8g/dL with IQ range 2.7g/dL to 4.0g/dL and prothrombin activity had median of 98% with IQ range of 64% to 102%.

The total white blood cell counts of PSC patients ranged from 2140 to 9400 with median of 5420 (IQ25-75th of 3910 to 8000) and of control group ranged from 5780 to 11210 with median of 7230 (IQ25-75th of 6500 to 8450). The lymphocyte counts of PSC patients ranged from 673 to 5200 with median of 1532 (IQ25-75th of 1210 to 2740) and of control group ranged 2023 to 3923 with median of 2562 (IQ25-75th of 2275 to 3140). The monocyte counts of PSC group ranged from 100 to 770 with median of 334 (IQ25-75th of 270 to 639) and of control group ranged from 120 to 560 with median of 362 (IQ25-75th of 325 to 422).

There was a statistically significant difference between the patient group and controls with respect to total white blood cell count with $p=0.023$, being that the group of patients had lower counts. The same has been found when analyzing the total number of lymphocytes, with $p=0.029$. On the other hand, there was no statistically significant difference between groups for the monocyte count.

Immunophenotyping results

At this stage of the study, it was performed immunophenotypic evaluation of lymphocytes and monocytes of patients and the control group. Due to technical problems with the cytometry process (loss of samples during preparation or reading) the number of patients in each group was variable for each marker.

The first cytometric evaluation performed was the total number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and CD14⁺ (monocytes) cells. Figures 1, 2 and 3 show the results.

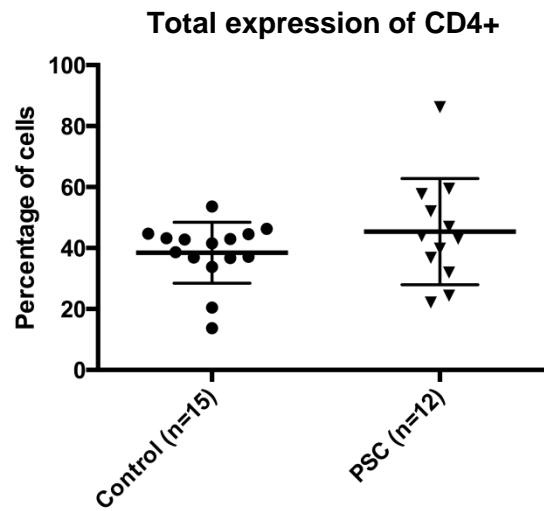


Figure 1: Percentage of CD4⁺ T cells in PBMC of PSC and control patients with median and interquartile range 25-75th representation.

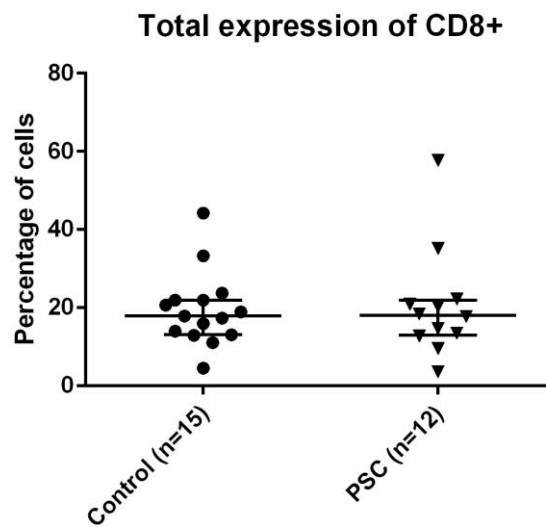


Figure 2: Percentage of CD8⁺ T cells in PBMC of PSC and control patients with median and interquartile range 25-75th representation.

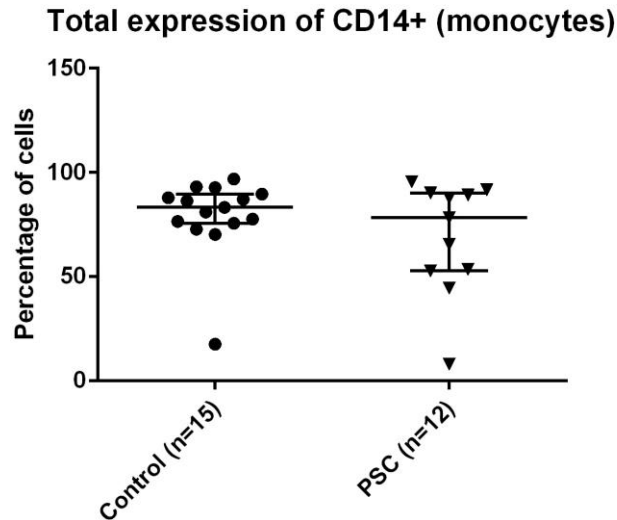


Figure 3: Percentage of CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC of PSC and control patients with median and interquartile range 25-75th representation.

Despite the lower total lymphocyte counts presented by patients, interestingly, they had a higher CD4⁺ T lymphocyte count when compared to controls, but with no statistically significant difference ($p= 0.320$ and confidence interval -4.9 to 15.3). The CD8⁺ T lymphocyte count also showed no difference ($p= 0.905$ and confidence interval -7.3 to 6.7) and, on the other hand, the monocyte count (CD14⁺ cells) was lower in patients but with no statistically significant difference ($p= 0.495$ and confidence interval -28.3 to 7.9).

Tables 1 and 2 show the results of statistical comparison with p value and confidence interval for difference of medians in PSC and control group with regard to cell surface markers percentages of expression evaluated in CD4⁺ T and CD8⁺ T cells. Table 3 shows the results of statistical comparison (p value and confidence interval) of PSC and control group with regard to medians comparison of expression of the cell surface markers evaluated in monocytes. For the results that showed a statistically significant difference ($p \leq 0.05$), scatter dot plots will also be presented (Figures 4, 5, 6, 7 and 8). A table with the results of means and standard error of the mean for all the evaluated markers are available as supplemental results (anexo A).

Table 1- Results of median and interquartile range (IQ25-75th) of percentage of expression of surface markers in the two groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD4⁺ T cells.

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in PSC group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between groups
CD45RA ⁺ in CD4 ⁺ T cells	18.4 [11.2-27.8] (n=14)	25.1 [15.6-40.5] (n=10)	<i>p</i> =0.229 (-4.3 to 20.7)
CD45RO ⁺ in CD4 ⁺ T cells	13.8 [8.3-17.4] (n=14)	10.4 [8.3-14.7] (n=10)	<i>p</i> =0.821 (-6.2 to 5.9)
CCR3 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	1.7 [0.75-2.3] (n=12)	20.9 [4.9-26.75] (n=8)	<i>p</i> =0.0001 (3.6 to 25.6)
CCR5 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	2.0 [1.5-4.8] (n=12)	4.8 [3.8-6.2] (n=8)	<i>p</i> =0.134 (-0.7 to 3.9)
CD25 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	1.2 [0.7-2.0] (n=14)	2.7 [1.8-3.5] (n=12)	<i>p</i> =0.007 (0.3 to 2.2)
CD95 ⁺ (Fas) in CD4 ⁺ T cells	15.0 [11.0-17.0] (n=15)	15.1 [9.2-21.5] (n=11)	<i>p</i> =0.788 (-4.1 to 5.7)
CD95L ⁺ (FasL) in CD4 ⁺ T cells	0.3 [0.2-0.8] (n=15)	1.5 [0.8-2.0] (n=9)	<i>p</i> =0.005 (0.4 to 1.5)
CTLA-4 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	0.5 [0.4-0.9] (n=14)	2.6 [0.9-6.2] (n=10)	<i>p</i> =0.003 (0.4 to 4.7)
CD69 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	0.7 [0.3-1.2] (n=14)	3.8 [0.4-6.5] (n=10)	<i>p</i> =0.071 (-0.1 to 5.3)
CD40L ⁺ in CD4 ⁺ T cells	0.2 [0.1-0.6] (n=14)	1.8 [0.6-2.0] (n=9)	<i>p</i> =0.005 (0.2 to 1.8)
HLA-DR ⁺ in CD4 ⁺ T cells	1.3 [1.2-2.1] (n=9)	5.1 [2.6-6.4] (n=10)	<i>p</i> =0.003 (-4.7 to -1.0)
CD28 ⁺ in CD4 ⁺ T cells	35.9 [34.5-44.8] (n=9)	38.3 [23.4-45.9] (n=12)	<i>p</i> =0.715 (-14.1 to 9.2)
CD28 ^{NEG} in CD4 ⁺ T cells	1.5 [0.7-3.2] (n=9)	3.2 [1.5-4.8] (n=12)	<i>p</i> =0.057 (-0.1 to 3.3)
CD4 total em PBMC*	41.7 [36.7-44.5] (n=15)	43.5 [33.2-56.3] (n=12)	<i>p</i> =0.320 (-4.9 to 15.3)

*peripheral blood mononuclear cells

Table 2- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in the two groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD8⁺ T cells.

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in PSC group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between groups
CD45RA ⁺ in CD8 ⁺ T cells	14.4 [9.5-18.4] (n=13)	19.9 [13.1-23.4] (n=8)	<i>p</i> =0.066 (-1.3 to 11.2)
CD45RO ⁺ in CD8 ⁺ T cells	4.7 [2.8-12.2] (n=14)	3.2 [1.9-4.9] (n=12)	<i>p</i> =0.159 (-6.1 to 0.5)
CCR3 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.6 [0.3-0.9] (n=12)	1.7 [1.0-2.6] (n=10)	<i>p</i> =0.002 (0.4 to 2.0)
CCR5 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	1.2 [0.8-2.2] (n=12)	1.6 [0.9-2.6] (n=10)	<i>p</i> =0.663 (-0.9 to 1.1)
CD25 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.3 [0.2-0.4] (n=13)	0.4 [0.2-0.6] (n=12)	<i>p</i> =0.780 (-0.01 to 0.3)
CD95 ⁺ (Fas) in CD8 ⁺ T cells	4.6 [3.5-6.3] (n=14)	4.5 [3.2-11.6] (n=8)	<i>p</i> =0.771 (-2.1 to 5.9)
CD95L ⁺ (FasL) in CD8 ⁺ T cells	0.3 [0.1-0.9] (n=15)	0.9 [0.3-1.3] (n=11)	<i>p</i> =0.093 (-0.1 to 0.8)
CTLA-4 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.3 [0.2-0.6] (n=14)	0.5 [0.2-1.0] (n=11)	<i>p</i> =0.260 (-0.1 to 0.6)
CD69 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.5 [0.3-0.7] (n=12)	1.1 [0.6-1.8] (n=11)	<i>p</i> =0.018 (0.1 to 1.3)
CD40L ⁺ in CD8 ⁺ T cells	0.2 [0.1-0.4] (n=13)	0.3 [0.2-0.5] (n=10)	<i>p</i> =0.349 (-0.1 to 0.3)
HLA-DR ⁺ in CD8 ⁺ T cells	2.0 [1.1-5.6] (n=12)	2.6 [1.3-3.7] (n=12)	<i>p</i> =0.785 (-2.5 to 1.5)
CD28 ⁺ in CD8 ⁺ T cells	15.3 [11.4-22.4] (n=13)	12.5 [7.5-15.5] (n=11)	<i>p</i> =0.245 (-9.7 to 2.1)
CD28 ^{NEG} in CD8 ⁺ T cells	3.6 [1.9-6.5] (n=13)	5.1 [2.0-7.8] (n=11)	<i>p</i> =0.578 (-2.6 to 3.6)
CD8 total em PBMC*	17.8 [13.0-21.9] (n=15)	18.0 [12.9-21.8] (n=12)	<i>p</i> =0.905 (-7.3 to 6.7)

*peripheral blood mononuclear cells

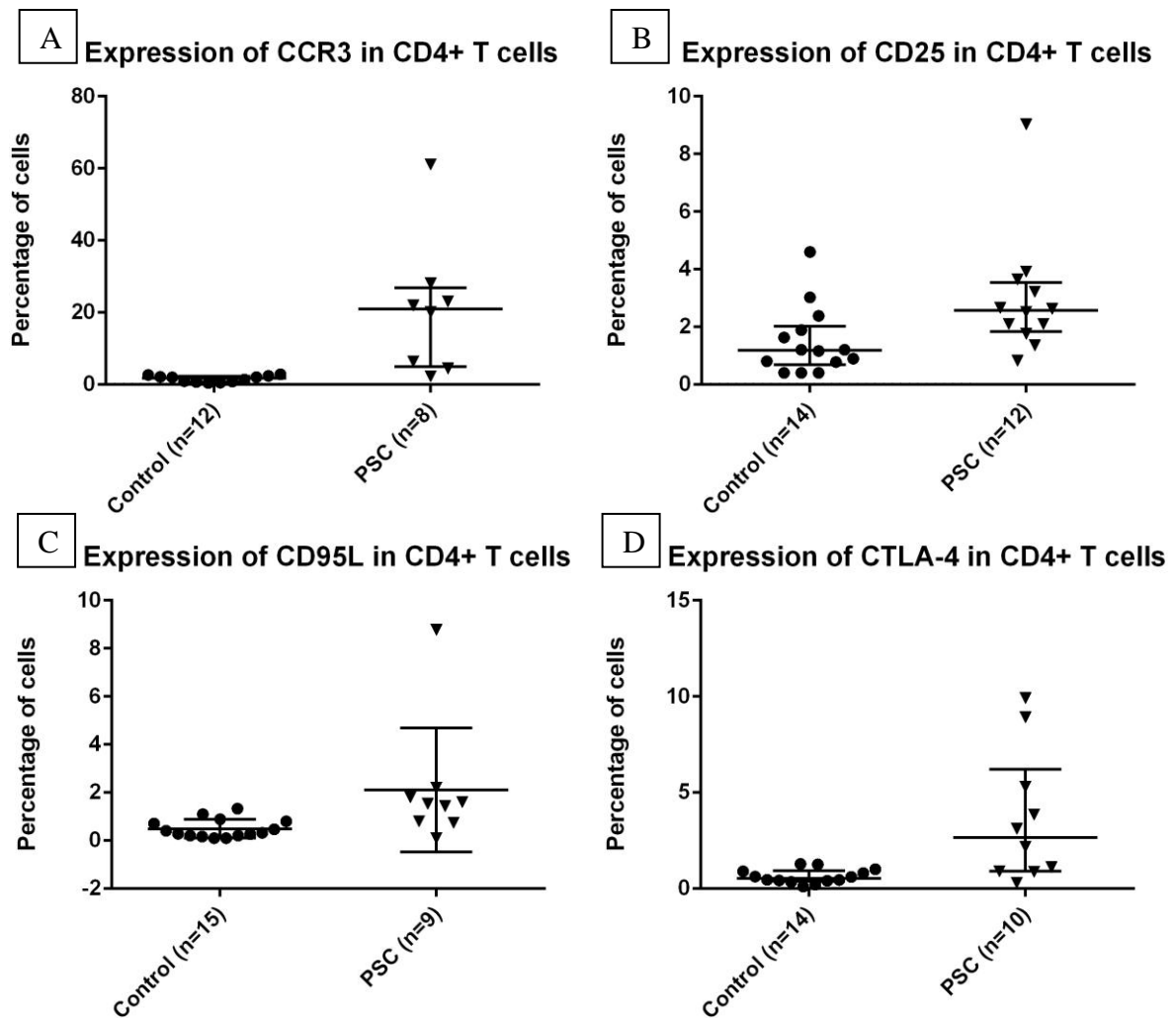


Figure 4: Expression of CCR3 (A), CD25 (B), CD95L (C) and CTLA-4 (D) in CD4⁺ T cells in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation.

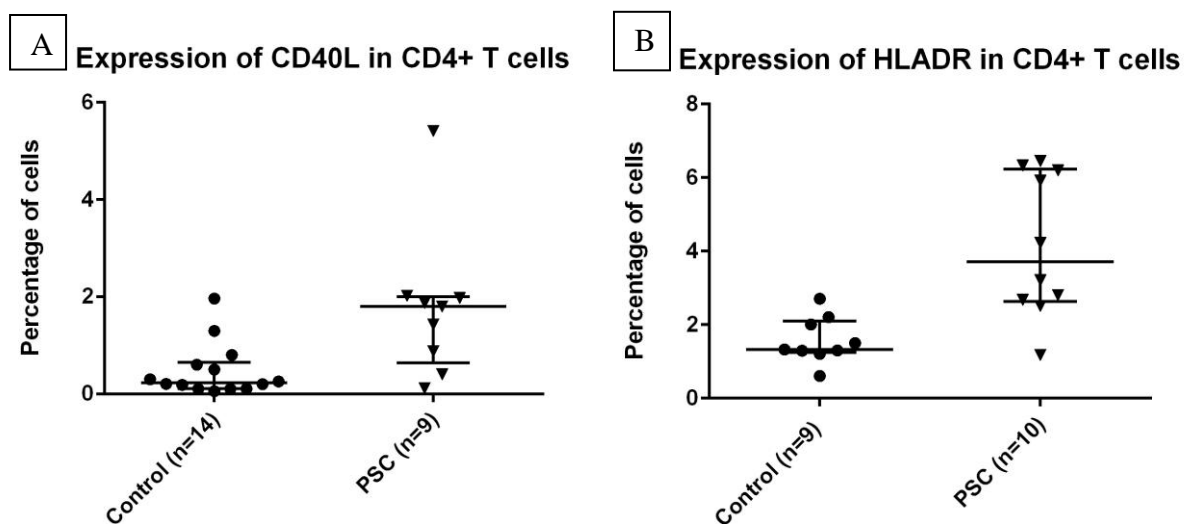


Figure 5: Expression of CD40L (A) and HLA-DR (B) in CD4⁺ T cells in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation.

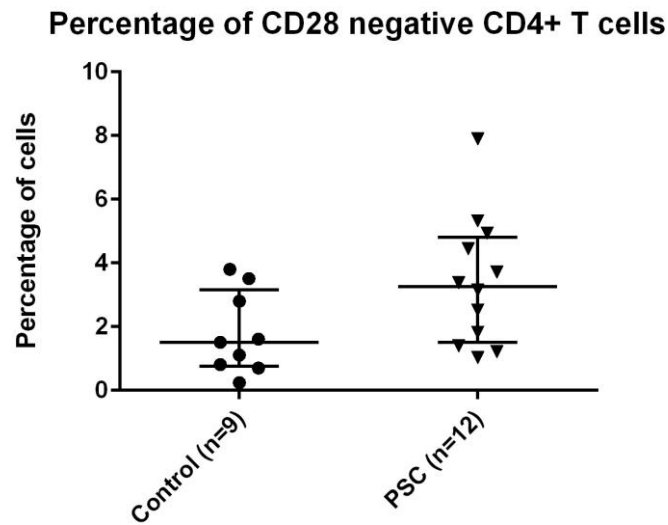


Figure 6: Percentage of CD4⁺ T cells not expressing CD28 in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation.

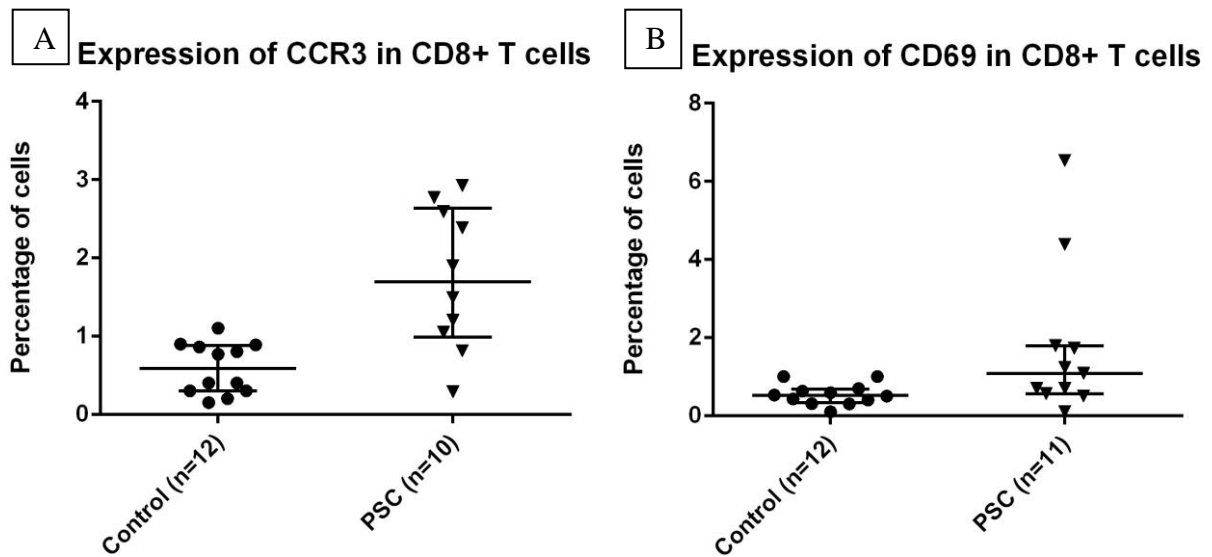


Figure 7: Expression of CCR3 (A) and CD69 (B) in CD8⁺ T cells in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range 25-75th representation.

Table 3- Results of median and interquartile range (25-75th) of percentage of expression of surface markers in the two groups with total number of patients in each evaluation; *p* value and confidence interval by nonparametric statistical test comparison between patients and control group for CD14⁺ cells (monocytes).

Surface Marker Tested	Median and IQ range in control group (n of patients)	Median and IQ range in PSC group (n of patients)	<i>p</i> value and confidence interval for difference between groups
CD80 ⁺ in CD14 ⁺ cells	1.4 [0.3-2.8] (n=11)	3.1 [1.2-5.4] (n=15)	<i>p</i> =0.042 (0.04 to 3.7)
CD86 ⁺ in CD14 ⁺ cells	42.8 [3.6-81.9] (n=6)	40.6 [3.9-82.1] (n=7)	<i>p</i> =0.234 (-76.6 to 7.7)
HLA-DR ⁺ in CD14 ⁺ cells	83.5 [74.5-89.2] (n=11)	79.8 [34.2-90.5] (n=15)	<i>p</i> =0.565 (-40.3 to 7.0)
CD14 total em PBMC*	83.2 [75.6-89.6] (n=15)	78.1 [52.6-90.0] (n=12)	<i>p</i> =0.495 (-28.3 to 7.9)

*peripheral blood mononuclear cells

Expression of CD80 in CD14⁺ cells (monocytes)

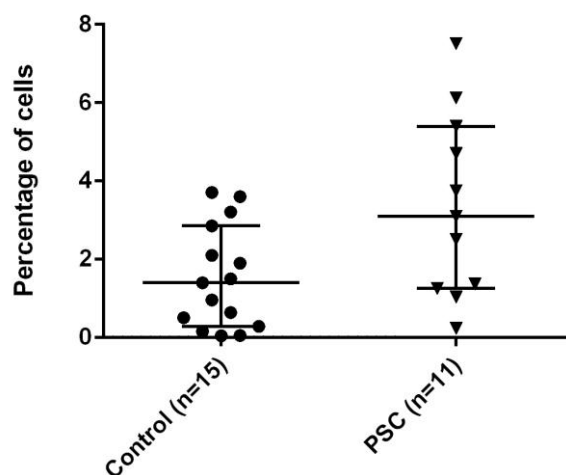


Figure 8: Expression of CD80 in CD14⁺ cells (monocytes) in PBMC of PSC and control groups with median and interquartile range (25-75th) representation.

Discussion

PSC is a low prevalence disorder, as a result, few case series of children with this diagnosis are described in the literature.³⁰⁻³⁵ Interestingly, our study population showed characteristics similar to those described in other studies in many aspects. Higher frequency among males was common to all pediatric studies³⁰⁻³⁵ with ratios of 1.3: 1 to 2.5: 1 compared to females, and the mean age at diagnosis near 13 years was

similarly reported in four studies.^{31,33-35} Clinical finding of chronic liver disease and incidental findings were the commonest presentation in this sample and the most significant laboratory abnormality are an increase of GGT, that were also reported in the other pediatric case series.³⁰⁻³⁵

Immunophenotyping findings

On the initial evaluation, despite of having a lower global count of leukocyte cells than the control group, in most cases this is secondary to hypersplenism. In patients group we observe a higher percentage of CD4⁺ T cells, but without difference statistically significant. These cells were already considered important to the immune response on several autoimmune disorders, including PSC.^{14,24-27} The CD8⁺ T cells and monocytes seem to have minor influence on autoimmune mechanisms, but are also important for understanding the pathophysiology of PSC. Our patients do not have an important difference on CD8⁺ T cells and CD14⁺ (monocytes) percentages when compared with controls.

When evaluating specific markers, the CD45 marker was evaluated in two subtypes: CD45RA for naive T cells (unstimulated) and CD45RO as memory T cell marker and we didn't find a statistically significant difference among patients and controls for them in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, differently from what is reported in AIH studies, in which a greater conversion of CD4⁺CD45RO⁻ T cells (naive) in CD4⁺CD45RO⁺ T cells (primed) is described as a possible autoimmune mechanism.³⁶

Human chemokine receptor CCR3 (hCCR3) belongs to the G protein coupled receptors (GPCRs) superfamily of membrane proteins and plays major roles in allergic diseases and angiogenesis.³⁷ It is more common in basophils and eosinophils, but is also found in lymphocytes. It has been observed a role in some autoimmune conditions as atopic dermatitis, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.³⁸⁻⁴⁰ Interestingly, Manousou *et al*⁴¹ founded a higher positivity of CCR3 in peripheral T lymphocytes from adult patients with ulcerative colitis (UC) compared to Crohn's disease and controls. Similarly, higher and more frequent expression of CCR3 was observed in colonic biopsies from adult patients with UC. Considering the frequent association of this disease to PSC, we believe that our finding of higher expression of this receptor in both types of T lymphocyte can have an unveiled meaning on the pathophysiology of PSC in children and adolescents.⁴¹ As there were no other studies evaluating this fact, we believe that further research may be important to better

evaluate this finding, considering the existence of possible antagonists of this receptor that could be potential targets for a treatment for PSC.

Cluster of differentiation (CD) CCR5 acts as cytokine receptor CCR5 for pro-inflammatory cytokines by stimulating the cells to increased production of gamma interferon. It was described as a possible autoimmune mechanism in AIH and there are controversial findings in PSC.⁴² While Eri *et al*⁴³ showed that CCR5-Delta32 allele frequency was significantly higher in PSC among adult patients compared to controls, Melun *et al*⁴⁴ did not find any statistically significant difference in the occurrence of this mutation in patients and controls. In our study there was no statistically significant difference between patients and controls for the percentage of lymphocytes expressing this receptor.

The alpha chain of the IL-2 receptor, also named CD25, was also evaluated. Although previously reported as a marker of regulatory T cells (T reg), it can also be found in memory T cells and that CD25⁺ and FOXP3⁺ is a more reliable profile for T regs.^{45,46} Using the former, Longhi *et al*^{47,48} had described an impairment in number and function of regulatory T cells in autoimmune liver disease in young patients, including children. Recently, using a more specific profile for Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺), the studies of Peiseler *et al*⁴⁹ and Liberal *et al*⁵⁰ showed opposite results in adult patients. The first demonstrated a higher frequency of Treg cells in AIH adult patients with active disease and the second showed numerically and functionally impairment of Treg cells in autoimmune liver disease patients. We found a higher percentage of CD25 in CD4⁺ T cells in our PSC pediatric patients, but we cannot assure that they are Treg cells. A similar finding was described by Kekilli *et al*⁵¹ in adult patients with UC concurrent with PSC, with these patients presented a higher percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells when compared to isolated UC patients.

Fas (CD95) is part of the tumor necrosis factor family, and it induces receptor-mediated programmed cell death (apoptosis) through engagement with its ligand (FasL/CD95L).⁵² It indirectly controls the number of antigen-activated lymphocytes.⁵² Although there are studies showing a possible Fas participation in autoimmunity of autoimmune diseases such as AIH, we found no studies that assessed these findings specifically in the PSC. In AIH, Ogawa *et al*³⁰ and Tsirikoni *et al*⁵³ found an increase in CD95 (Fas) CD4⁺ positive and CD8⁺ T cell numbers. In Tsirikoni *et al*⁵³ was found an increased in TNF- α and IFN- γ production in cultured lymphocytes cells, suggesting these cytokines could be involved in accelerating cell death

mechanisms. Genetic studies suggest that some mutations can affect the function of Fas receptor.⁵⁴⁻⁵⁶ We believe that more studies are needed to demonstrate the importance of this finding in the PSC.

CTLA4 is an inhibitory receptor expressed on a subset of T lymphocytes and its single nucleotide polymorphisms has been implicated in several immune-mediated diseases, including autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis.⁵⁷⁻⁶⁰ It is expressed on the surface of T cells, induces peripheral tolerance by binding CD80 and CD86 on antigen-presenting cells. In doing so, CTLA-4 competes with the co-stimulatory molecule CD28, reducing the immune response.⁵⁷ Kurokohchi *et al*⁶¹ found that expression of CTLA-4 was reduced in inflammatory cells from the peripheral blood of AIH adult patients, compared with controls. However, the findings related to CTLA-4 in PSC are different, since the study that evaluated the genetic association of CTLA-4 polymorphisms does not find association.⁶² It is interesting since is quite common in autoimmune diseases to have an increase of CTLA4 expression.⁵⁷ Our study found a higher percentage of CD4⁺ T lymphocytes expressing this marker when compared to the control. This finding, not yet described in the literature, may represent a further feature of this disease.

In other autoimmune diseases, particularly in lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and autoimmune myocarditis, CD69 has been studied as a possible marker involved in the pathophysiology of autoimmunity. It acts on the activation of immune cells, through a stimulation of natural killer (NK) cells for increased production of pro-inflammatory cytokines such as IL-2, but the mechanism of this action is still unclear.⁶³ Recent studies have suggested that CD69 participates of a complex immunoregulatory system, and that it could be a molecular target for the therapy of immune-mediated diseases.⁶⁴ As this is the first study to evaluate CD69 in PSC and we observe a higher percentage of CD8⁺ T lymphocytes expressing it in children and adolescents with PSC, more studies are necessary to elucidate the meaning of this finding.

Liaskou *et al*⁶⁵ showed that, when compared with CD28⁺ T cells, activated CD28⁻ T cells produce high levels of interferon γ and TNF α , inducing up-regulation of intercellular cell adhesion molecule-1, HLA-DR and CD40L, which are important ligands for immune activated T cells. Other authors also described significantly greater proportion of CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁻ cells that infiltrate in liver tissue of adult patients with PSC, leading to a pro-inflammatory environment rich in TNF α .⁶⁶ The

higher expression of HLA-DR and CD40L observed in the patients in our study and the reduced number of TCD4⁺ cells expressing CD28 (T CD4⁺CD28⁻ cells) are important findings that may be part of this possible pathophysiological mechanism. In combination, they can represent an attainable pathway for treatment, considering the existence of anti-CD40L.⁶⁷

CD40L, also known as CD154, is mainly present on activated lymphocytes (primed). It is described as a possible pathway for the treatment of autoimmune diseases due to its role in autoimmune regulation, activating phagocytic cells.⁶⁷ Recent studies have tested an anti-CD40L antibody in primary biliary cirrhosis in animal models and described a good response, although it has been temporary.⁶⁸ Other studies follow the same line and attempt to raise anti-CD40L antibodies for use in the treatment of autoimmune and oncological diseases.^{67,69}

Lastly, for the evaluation of monocytes we looked for HLA-DR, CD80 and CD86. CD80 (or B7-1) and CD86 (or B7-2) are found on activated B cells and monocytes.^{70,71} They work providing a co-stimulatory signal necessary for T cell activation and survival and act as ligands for two different proteins on the T cell surface: CD28 and CTLA-4, already cited above.⁷⁰ Kurokohchi *et al*⁶¹ showed reduced levels of CD80⁺ and CD86⁺ in PBMC of adults and adolescents patients with AIH when compared with healthy controls and, in contrast, a higher number of cells expressing this markers in liver infiltrating mononuclear cells. There is no similar description to date in patients with PSC, and we found greater expression of the CD80 marker in PBMC of monocytes in our study. We believe that further studies are needed to assess the role of these markers in the PSC.

We describe that a complex immunopathological mechanism that may be involved in the pathophysiology of PSC, with participation of changes in the immune system regulatory mechanisms represented by cell surface markers and cytokines mentioned. The main findings were related to CD4⁺ T lymphocytes, and they can be considered the most important cells in PSC. The findings related to CTLA-4, CD40L, HLA-DR, CD28 should receive special attention because they are already reported in other studies and have the potential to be treatment targets.

References

1. Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2013; 382:1587-99. [PMID: 23810223 DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60096-3]
2. Chapman RW, Arbogh BA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, *et al.* Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut* 1980; 21:870-77. [PMID: 7439807]
3. Schrupf E, Boberg KM. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15(4):553-62. [PMID: 11492967]
4. Eaton JE, Talwalkar JA, Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* 2013; 145:521-36. [PMID: 23827861 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.06.052]
5. Singh S, Talwalkar JA. Primary sclerosing cholangitis: Diagnosis, prognosis, and management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:898-907. [PMID: 23454027 DOI: 10.1016/j.cgh.2013.02.016]
6. Chapman R, Fevery J, Kalloo A, Nagorney DM, Boberg KM, Shneider B, *et al.* American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2010; 51:660-678. [PMID: 20101749 DOI: 10.1002/hep.23294]
7. Dave M, Elmunzer BJ, Dwamena BA, Higgins PD. Primary sclerosing cholangitis: Meta-analysis of diagnostic performance of MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2010; 256:387-96. [PMID: 20656832 DOI: 10.1148/radiol.10091953]
8. Ahrar H, Jafarpishe MS, Helmatnia A, Solouki R, Emami MH. Magnetic resonance cholangiography compared with endoscopic retrograde cholangiography in the diagnosis of primary sclerosing cholangitis. *J Res Med Sci* 2014; 19(12):1150-4. [PMID: 25709656]
9. Terjung B, Herzog V, Worman HJ, Gestmann I, Bauer C, Sauerbruch T, *et al.* Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel disease and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. *Hepatology* 1998; 28:332-40. [PMID: 9695994]
10. Terjung B, Sohne J, Lechtenberg B, Gottwein J, Muennich M, Herzog V, *et al.*

- p-ANCAs in autoimmune liver disorders recognize human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* 2010; 59:808-16. [PMID: 19951907 DOI: 10.1136/gut.2008.157818]
11. Maggiore G, Riva S, Sciveres M. Autoimmune diseases of the liver and biliary tract and overlap syndromes in childhood. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2009; 55(1):53-70. [PMID:19212308]
 12. Broomé U, Olsson R, Lööf L, Bodemar G, Hulcrantz R, Danielsson A, *et al.* Natural History and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996; 38:610-15. [PMID: 8707097]
 13. Card TR, Solaymani-Dodaran M, West J. Incidence and mortality of primary sclerosing cholangitis in the UK: a population-based cohort study. *J Hepatol* 2008; 48: 939-944 [PMID: 18433916 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.02.017]
 14. Liaskou E, Hirschfield GM, Gershwin ME. Mechanisms of tissue injury in autoimmune liver diseases. *Semin Immunopathol* 2014; 36:553-568. [PMID: 25082647 DOI: 10.1007/s00281-014-0439-3]
 15. Bowlus CL. Cutting edge issues in primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41:139–150. [PMID: 21170605 DOI: 10.1007/s12016-010-8221-3]
 16. Karlsen TH, Franke A, Melum E, Kaser A, Hov JR, Balschun T, *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2010; 138:1102–1111. [PMID: 19944697 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.11.046]
 17. Melum E, Franke A, Schramm C, Weismuller TJ, Gotthardt DN, Offner FA, *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nat Genet* 2011; 43:17–19. [PMID: 21151127 DOI: 10.1038/ng.728]
 18. 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. *J Hepatol* 2012; 57:366–375. [PMID: 22521342 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.03.031]
 19. Srivastava B, Mells GF, Cordell HJ, Muriithi A, Brown M, Ellinghaus E, *et al.* Fine mapping and replication of genetic risk loci in primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47:820–826. [PMID: 22554193 DOI: 10.3109/00365521.2012.682090]
 20. Liu JZ, Hov JR, Folseraas T, Ellinghaus E, Rushbrook SM, Doncheva NT, *et al.* Dense genotyping of 564 immune-related disease regions identifies nine new risk

- loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet* 2013; 45:670–675. [PMID: 23603763 DOI: 10.1038/ng.2616]
21. Spurkland A, Saarinen S, Boberg KM, Mitchell S, Broome U, Caballeria L, *et al.* HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations. *Tissue Antigens* 1999; 53:459–469. [PMID: 10372541]
 22. Donaldson PT, Norris S. Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity* 2002; 35(8):555–564. [PMID: 12765483]
 23. O’Hara SP, Splinter PL, Trussoni CE, Gajdos GB, Lineswala PN, LaRusso NF. Cholangiocyte N-Ras protein mediates lipopolysaccharide-induced interleukin 6 secretion and proliferation. *J Biol Chem* 2011; 286:30352–30360. [PMID:21757746 DOI: 10.1074/jbc.M111.269464]
 24. Hashimoto E, Lindor KD, Homburger HA, Dickson ER, Czaja AJ, Wiesner RH, *et al.* Immunohistochemical characterization of hepatic lymphocytes in primary biliary cirrhosis in comparison with primary sclerosing cholangitis and autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:1049–1055. [PMID: 8231268]
 25. Whiteside TL, Lasky S, Si L, Van Thiel DH. Immunologic analysis of mononuclear cells in liver tissues and blood of patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1985; 5:468-474. [PMID: 3158582]
 26. Snook JA, Chapman RW, Sachdev GK, Heryet A, Kelly PM, Fleming KA, Jewell DP. Peripheral blood and portal tract lymphocytes populations in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1989; 9:36-41. [PMID: 2570096]
 27. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, Panasiuk B, Wysocka J. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood in primary sclerosing cholangitis. *Hepato-gastroenterology* 2004; 51:1289–1291. [PMID: 15362735]
 28. Torres KCL, Antonelli LRV, Souza ALS, Teixeira MM, Dutra WO, Gollob KJ. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. *Journal of Neuroimmunology* 2005; 166:144 – 157. [PMID: 16026859]
 29. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol* 1992; 34(1):64-74. [PMID: 1356957].
 30. Debray D, Pariente D, Urvoas E, Hadchouel M, Bernard O. Sclerosing cholangitis in children. *J Pediatr* 1994; 124(1):49-56. [PMID: 8283375]

31. Wilchanski M, Chait P, Wade JA, Davis L, Corey M, St Louis P, *et al.* Primary sclerosing cholangitis in 32 children: clinical, laboratory and radiographic features with survival analysis. *Hepatology* 1995; 22: 1415-1422. [PMID: 7590657]
32. Gregorio GV, Portman B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, *et al.* Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001; 33(3):544-53. [PMID: 11230733]
33. Feldstein AE, Perrault J, El-Youssif M, Lindor KD, Freese DK, Angulo Paul. Primary sclerosing cholangitis in children: a long-term follow-up study. *Hepatology* 2003; 38(1):210-7. [PMID: 12830004]
34. Miloh T, Arnon R, Shneider B, Suchy F, Kerkar N. A retrospective single-center review of primary sclerosing cholangitis in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7(2):239-45. [PMID: 19121649 DOI: 10.1016/j.cgh.2008.10.019]
35. Rojas CP, Bodicharla R, Campuzano-Zuluaga G, Hernandez L, Rodriquez MM. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis in children and adolescents. *Fetal Pediatr Pathol* 2014; 33(4):202-9. [PMID: 24754367 DOI: 10.3109/15513815.2014.898721]
36. Ogawa S, Sakaguchi K, Takaki A, Shiraga K, Sawayama T, Mouri H, Miyashita M, Koide N, Tsuji T. Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 69-75. [PMID: 10719750 DOI: 10.1046/j.1440-1746.2000.02044.x]
37. Wang M, Ge B, Li R, Wang X, Lao J, Huang F. Milligram production and biological activity characterization of the human chemokine receptor CCR3. *PLoS One* 2013; 8(6):e65500. [DOI: 10.1371/journal.pone.0065500].
38. Gaspar K, Kukova G, Bunemann E, Bühren BA, Sonkoly E, *et al.* The chemokine receptor CCR3 participates in tissue remodeling during atopic skin inflammation. *J Dermatol Sci* 2013; 71(1): 12-21. [PMID: 23702389 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.011]
39. Freutel S, Gaffal E, Zahn S, Bieber T, Tüting T, Wenzel J. Enhanced CCR5+/CCR3+ T helper cell ratio in patients with active cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2011; 20(12):1300-4. [PMID: 21844117 DOI: 10.1177/0961203311409267]

40. Aloush V, George J, Elkayam O, Wigler I, Oren S, Entin-Meer M, *et al.* Decreased levels of CCR3 in CD4⁺ lymphocytes of rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28(4):462-7. [PMID: 20659406]
41. Manousou P, Kolios G, Valatas V, Drygiannakis I, Bourikas L, Pyrovolaki K, *et al.* Increased expression of chemokine receptor CCR3 and its ligands in ulcerative colitis: the role of colonic epithelial cells in *in vitro* studies. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(2):337-47. [PMID: 21077277]
42. Ajuebor M, Carey J, Swain M. CCR5 in T cell-mediated liver disease: what's going on? *J Immunol* 2006; 177(4):2039-45. [PMID: 16887960]
43. Eri R, Jonsson JR, Pandeya N, Purdie DM, Clouston AD, Martin N, *et al.* CCR5-Delta32 mutation is strongly associated with primary sclerosing cholangitis. *Genes Immun* 2004; 5:444-450. [PMID: 15215889]
44. Melum E, Karlsen TH, Broomé U, Thorsby E, Schrumpt E, Boberg KM, *et al.* The 32-base pair deletion of the chemokine receptor 5 gene (CCR5-Delta32) is not associated with primary sclerosing cholangitis in 363 Scandinavian patients. *Tissue Antigens* 2006; 68:78-81. [PMID: 16774544]
45. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. *Science* 2003; 299(5609):1057-61. [PMID: 12522256 DOI: 10.1126/science.1079490]
46. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531–62. [PMID: 15032588 DOI:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122]
47. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41(1):31-37. [PMID: 15246204]
48. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al.* Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176:4484-4491. [PMID: 16547287]
49. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, *et al.* FOXP3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012; 57(1):125-32. [PMID: 22425700 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.029].
50. Liberal R, Grant CR, Holder BS, Cardone J, Martinez-Llordella M, Ma Y, *et al.* In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis

- variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology* 2015; 62(3):863-75. [PMID: 25953611 DOI: 10.1002/hep.27884]
51. Kekilli M, Tunc B, Beyazit Y, Kurt M, Onal IK, Ulker A, *et al.* Circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the pathobiology of ulcerative colitis and concurrent primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci* 2013; 58(5):1250-5. [PMID: 23306841 DOI: 10.1007/s10620-012-2511-y].
 52. Anthony RS, Mckelvie ND, Craig JI, Parker AC. Fas antigen (CD95) expression in peripheral blood progenitor cells from patients with leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998; 30(5-6):449-58. [PMID: 9711907]
 53. Tsirikoni A, Kyriakou DS, Rigopoulou EI, Alexandrakis MG, Zachou K, Passam F, *et al.* Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; 42:393–399. [PMID: 15710223]
 54. Agarwal K, Czaja AJ, Donaldson PT. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis. *Tissue Antigens* 2007; 69:227–235. [PMID: 17493146]
 55. Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, Kanda T, Kojima H, Fukai K, *et al.* Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1322–1329. [PMID: 15929764]
 56. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 117:645–652. [PMID: 10464141]
 57. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity. *Genes and immunity* 2000; 1:170-184. [PMID: 11196709]
 58. Mattner J. Genetic susceptibility to autoimmune liver disease. *World J Hepatol* 2011; 3(1):1-7. [PMID: 21307981 DOI: 10.4254/wjh.v3.i1.1]
 59. Agarwal K, Jones D, Daly A, James OF, Vaidya B, Pearce S, *et al.* CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 32(4):538-41. [PMID: 10782900]

60. Agarwal K, Czaja A, Jones D, Donaldson P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000; 31:49-53. [PMID: 10613727]
61. Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, *et al.* Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12(16):2523-9. [PMID: 16688797]
62. Wiencke K, Boberg KM, Donaldson P, Harbo H, Ling V, Schrupp E, *et al.* No major effect of the CD28/CTLA4/ICOS gene region on susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41:586-591. [PMID: 16638702]
63. Martín P, Sánchez-Madrid F. CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses. *Sci Signal* 2011; 22(4):165pe14. [PMID: 21427408 DOI: 10.1126/scisignal.2001825]
64. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med* 2013; 19(10):625-32. [PMID: 23954168 DOI: 10.1016/j.molmed.2013.07.006]
65. Liaskou E, Jeffery LE, Trivedi PJ, Reynolds GM, Suresh S, Bruns T, *et al.* Loos of CD28 expression by liver-infiltrating T cells contributes to pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2014; 147:221-232. [PMID: 24726754 DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.003]
66. Kurokohchi K, Arima K, Masaki T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, *et al.* Analysis of CD28 and bcl-2 expression on peripheral blood and liver-infiltrating mononuclear cells in patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Immunol* 2006; 26(4):323-30. [PMID: 16779679]
67. Xie JH, Yamniuk AP, Borowski V, Kuhn R, Susulic V, Rex-Rabe S, *et al.* Engineering of a novel anti-CD40L domain antibody for treatment of autoimmune diseases. *J Immunol* 2014; 192(9):4083-92. [PMID: 24670803 DOI: 10.4049/jimmunol.1303239]
68. Tanaka H, Yang GX, Iwakoshi N, Knechtle SJ, Kawata K, Tsuneyama K, *et al.* Anti-CD40 ligand monoclonal antibody delays the progression of murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol* 2013; 174(3):364-71. [PMID:23981074 DOI: 10.1111/cei.12193]

69. Law CL, Grewal IS. Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges. *Adv Exp Med Biol* 2009; 647:8-36. [PMID: 19760064 DOI: 10.1007/978-0-387-89520-8_2]
70. Peach RJ, Bajorath J, Naemura J, Leytze G, Greene J, Aruffo A, *et al.* Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J Biol Chem* 1995; 270 (36):211817. [PMID: 7545666 DOI: 10.1074/jbc.270.36.21181]
71. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol* 2003; 24(6):314-9. [PMID: 12810107]

5.3 Resultados e discussão complementares

Título: Avaliação comparativa de achados imunofenotípicos em crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite autoimune, colangite autoimune e colangite esclerosante primária.

RESUMO:

Objetivos: Hepatite autoimune (HAI) e colangite esclerosante primária (CEP) apresentam características clínicas e laboratoriais semelhantes, mas ao mesmo tempo características divergentes. Em algumas situações a HAI se manifesta com achados de acometimento de ductos biliares semelhantes à CEP, mas que apresentam melhora com o tratamento imunossupressor. Até o momento não são conhecidos os fatores imunes que podem justificar essa diferença. O objetivo principal dessa avaliação foi comparar os achados imunofenotípicos dos grupos de pacientes com diagnóstico de HAI ou HAI associada à colangite (CAI) com o grupo com diagnóstico de CEP.

Pacientes e métodos: Estudo prospectivo de coorte transversal com 20 crianças e adolescentes diagnosticados com HAI tipo 1, 19 com HAI tipo 1 e sobreposição à colangite e 12 com diagnóstico de CEP. Grupo controle com crianças e adolescentes hígidos e sem histórico de doenças autoimunes foi também avaliado. A imunofenotipagem para descrição do perfil de marcadores de superfície de linfócitos e de monócitos foi realizada em amostras de sangue periférico. Marcadores analisados foram: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CD25, CD95, CD95L, CCR3, CCR5, CD80.

Resultados: Pacientes com diagnóstico de HAI e CAI apresentaram maior porcentagem de linfócitos CD4⁺, mas sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CEP. Todos os três grupos de pacientes tiveram maior expressão de CCR3 em linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ quando comparados ao controle. Em linfócitos T CD4⁺, o grupo CEP teve maior porcentagem de expressão de CD25, CTLA-4, CD95L, CD69, CD40L, enquanto o grupo HAI apresentou maior expressão de CD45RO. Em monócitos, HLADR foi menos expresso nos grupos HAI e CAI.

Conclusão: Pacientes com HAI e CAI apresentaram diferenças importantes com relação à expressão de marcadores de superfície celular de linfócitos e monócitos, quando comparados ao grupo CEP. Esse achado pode advir de diferenças reais no mecanismo fisiopatológico das duas doenças, colocando a colangite autoimune como um quadro possivelmente mais ligado à hepatite autoimune, ou podem representar o

efeito do tratamento imunossupressor, considerando o fato que os pacientes com diagnóstico de HAI apresentavam boa resposta ao mesmo.

Palavras-chave: Hepatite autoimune, Colangite esclerosante primária, imunofenotipagem, doença autoimune, crianças.

Introdução

Hepatite autoimune (HAI) e colangite esclerosante primária (CEP) são condições raras em crianças e adolescentes, mas que podem levar a alta morbimortalidade se não reconhecidas adequadamente.^{1,2} Apresentam algumas características clínicas semelhantes, como forma de apresentação e sintomatologia, mas ao mesmo tempo características opostas como acometimento maior no gênero feminino na HAI e, de forma contrária, no gênero masculino na CEP.¹ Laboratorialmente chamam atenção na HAI as alterações de autoanticorpos e gamaglobulina, enquanto na CEP as alterações relacionadas às lesões de ductos biliares são mais evidentes, com o aumento de gamaglutamil transferase (GGT).³ Interessantemente, em algumas situações a HAI se manifesta com achados de acometimento de ductos biliares semelhantes à CEP, mas que apresentam regressão com o tratamento com imunossupressores.² Essa situação de sobreposição de achados de alterações hepáticas e canaliculares, também conhecida como "*overlap syndrome*" é mais frequente na faixa etária pediátrica.² Apesar de publicações relacionadas a pacientes adultos considerarem o quadro como um conjunto das duas doenças, as publicações pediátricas mais importantes caracterizam essa situação como um quadro de colangite esclerosante autoimune ("*autoimmune sclerosing cholangitis*"). São consideradas importantes suas características semelhantes à CEP, no entanto enfatiza-se a boa resposta ao tratamento que os pacientes apresentam, considerando essa situação como parte do mesmo processo patogênico da HAI.^{1,2} Não são conhecidos os fatores imunes que podem justificar essa diferença.

Tendo em vista a pouca disponibilidade de estudos correlacionando achados em HAI e CEP, principalmente em crianças e adolescentes, foi decidido ampliar o trabalho e apresentar os resultados imunofenotípicos comparativos entre todos os grupos avaliados.

Objetivos

O objetivo principal da avaliação nessa sessão foi comparar os achados imunofenotípicos dos grupos de pacientes com diagnóstico de HAI ou HAI associada à colangite com o grupo com diagnóstico de CEP.

Materiais e métodos

Trata-se de um estudo prospectivo, de uma coorte transversal com 20 pacientes com diagnóstico de HAI tipo 1, 19 pacientes com hepatite autoimune tipo 1 associada à colangite autoimune (CAI) e 12 com diagnóstico de CEP atendidos no período de janeiro de 1986 a janeiro de 2014. Foram incluídas crianças e adolescentes até 18 anos de idade na época do diagnóstico, com acompanhamento regular no serviço e boa adesão ao tratamento que aceitaram participar da pesquisa. Foram utilizados para confirmação diagnóstica os achados clínicos, laboratoriais, a histologia hepática e a resposta ao tratamento. O grupo controle foi composto por 15 crianças e adolescentes, hígidos em avaliação clínica e sem história pessoal ou familiar de doenças autoimunes.

O diagnóstico de HAI foi estabelecido segundo os critérios do Grupo Internacional para Estudo da HAI, publicados em 1993 e revisados em 1999 e 2008.^{4,5} Os pacientes que apresentaram quadro clínico ou laboratorial sugestivo de acometimento de vias biliares (elevação persistente de GGT e/ou má resposta ao tratamento imunossupressor) foram avaliados utilizando-se a colangiorrressonância magnética (CRM) para avaliar a presença de alterações em vias biliares, sendo revisada por três hepatologistas experientes da equipe de Hepatologia Pediátrica e dois radiologistas do serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UFMG. A biópsia hepática foi o dado utilizado para a confirmação final do diagnóstico. Todos os pacientes com diagnóstico de HAI associada ou não à colangite estavam em tratamento com imunossupressores.

O diagnóstico da CEP foi realizado por critérios clínicos, laboratoriais e de imagem, com os achados esperados nessa doença. A avaliação de imagem foi realizada pela CRM, com revisão do laudo pelas equipes de Hepatologia Pediátrica e Radiologia do serviço, e também com confirmação histológica. Foi realizada também investigação para exclusão de outras doenças hepáticas crônicas em todos os pacientes.

O achado histológico de hepatite de interface, associada à formação de rosetas, alargamento dos espaços portais por fibrose e infiltrado inflamatório principalmente plasmocitário em espaços periportais, portais e intralobulares representou o quadro histológico de hepatite autoimune. Quando, além desses achados, encontrou-se

acometimento de ductos por inflamação com alterações degenerativas do epitélio ductular, podendo haver também ductopenia e proliferação de ductos, confirmou-se o diagnóstico de hepatite autoimune com associação à colangite autoimune. Por outro lado, os achados de degeneração do epitélio do ducto biliar, infiltração de espaços porta por células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação de ductos associados com diminuição ou ausência de ductos biliares interlobulares e fibrose periductal concêntrica de ductos biliares interlobulares (fibrose "em casca de cebola") foram os achados histológicos utilizados para confirmar a CEP.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (número ETIC 0419.0.203.000-10 e número 17395313.0.0000.5149). O formulário de consentimento livre e esclarecido foi lido e assinado por pesquisadores, pacientes e grupo controle.

Imunofenotipagem

Amostra de aproximadamente 10 mL de sangue venoso periférico foi colhida de cada participante nos três grupos para estudar os perfis de marcadores de superfície relacionadas com processos inflamatórios em linfócitos e monócitos.

A citometria de fluxo para análise da descrição de linfócitos e de monócitos perfil de marcadores de superfície foi realizada como descrito por Torres *et al*⁶. As células mononucleares foram obtidas a partir de sangue periférico utilizando gradiente de Ficoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As células foram coradas com fluorocromos para os marcadores a serem analisados. As amostras foram adquiridas no citometro de fluxo (BD FACSCanto II®, Califórnia, EUA) e analisadas no software FlowJo 7.5® (FlowJo Co., Ashland, OR, EUA). As porcentagens de células T CD⁴⁺ e linfócitos T CD⁸⁺ e de monócitos CD14⁺ foram avaliadas, assim como a sua porcentagem de expressão de marcadores de superfície. Os marcadores de superfície analisados foram: CD45RA, CD45RO, CTLA-4, CD69, HLA-DR, CD28, CD40L, CD25, CD95, CD95L, CCR3, CCR5, CD80.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SPSS 17® (IBM Co., New York, EUA). A análise descritiva, utilizando média, mediana, desvio padrão, intervalo interquartil de 25 a 75 (IQ 25-75) e porcentagens foram utilizados para caracterizar o grupo de estudo. Os dados obtidos na imunofenotipagem foram avaliados

por análises comparativas das porcentagens de expressão dos marcadores nos grupos utilizando-se teste não paramétrico no *software* GraphPad Prism 5.03® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), já que não havia distribuição normal dos dados quando avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações com três ou mais grupos foram realizadas por teste não paramétrico Kruskal-Wallis, não havendo possibilidade de cálculo de intervalo de confiança (IC) por se tratar de comparação de múltiplos grupos. As comparações dos pares de grupos foram realizadas pelo teste Mann-Whitney com cálculo de intervalo de confiança e também pelo teste de comparação múltipla de Dunn. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

O número total de pacientes em cada análise para diferentes marcadores variou devido a problemas experimentais que causaram perdas de amostras. Estas perdas são inerentes ao método experimental utilizado.

Resultados

No momento da coleta de sangue para avaliação de citometria, os pacientes do grupo HAI apresentaram mediana de idade de 15 anos (IQ 13.5 a 20.5), do grupo CAI mediana também de 15 anos (IQ 12.3 a 18) e do grupo CEP, 13 anos (IQ 10.3 a 14.5). O grupo controle teve mediana de idade de 14.5 anos (IQ 12.8 a 17). O gênero feminino foi mais prevalente nos grupos HAI (65%) e CAI (52,6%), enquanto no grupo CEP prevaleceu o gênero masculino (58.3%).

Na primeira avaliação de imunofenotipagem, observamos que os pacientes com diagnóstico de HAI e HAI associada à colangite apresentaram maior porcentagem de células T CD4⁺ quando comparados ao grupo com diagnóstico de CEP, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p=0.267$). Este resultado está apresentado na Figura 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes para a expressão de CD8⁺ em células T ($p=0.710$) e de CD14⁺ em monócitos ($p=0.194$).

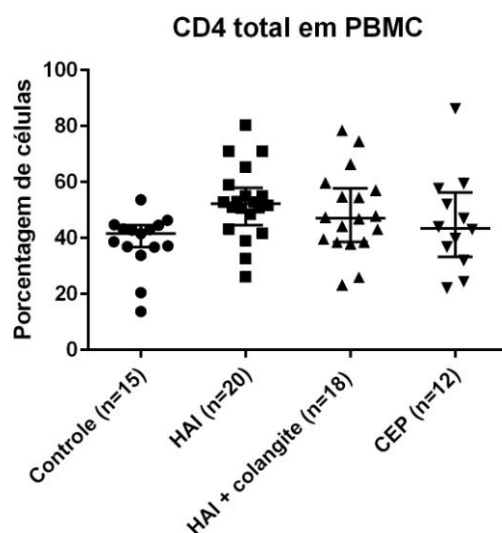


Figura 1: Expressão de CD4 em linfócitos em sangue periférico (PBMC) em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75.

A seguir apresentamos os resultados de imunofenotipagem que tiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes.

Com relação ao CCR3, todos os grupos de pacientes apresentaram maior número de células T CD4⁺ e também T CD8⁺ expressando esse marcador ($p=0.002$ e $p=0.006$, respectivamente) quando comparadas ao controle, não havendo, por outro lado, diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes entre si. Esses resultados são apresentados na Figura 2.

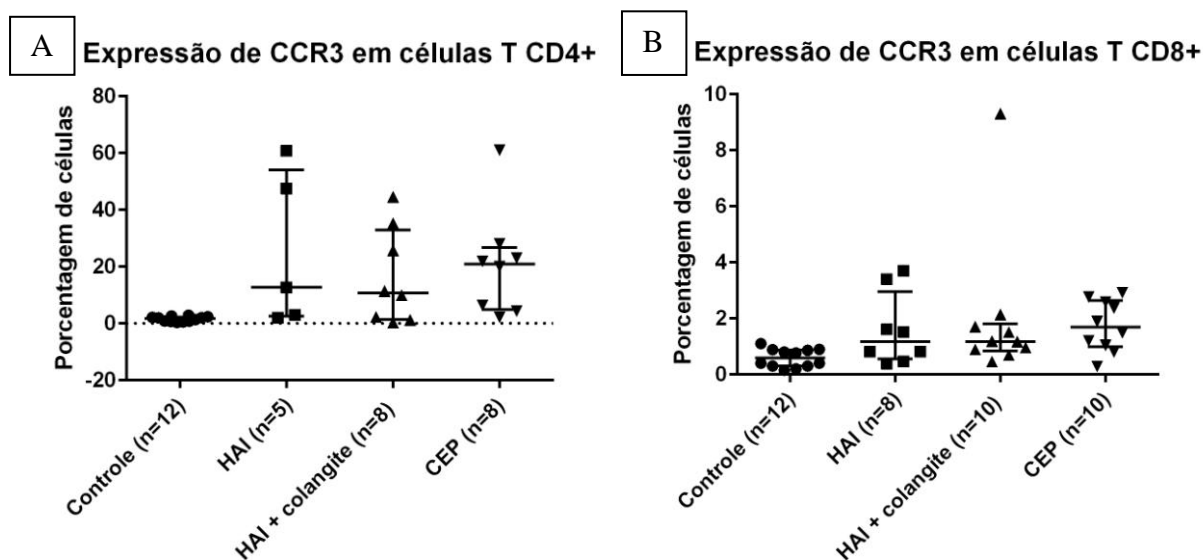


Figura 2: Expressão de CCR3 em células T CD4⁺ (A) e em células T CD8⁺ (B) em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75.

Quando avaliados os marcadores CD45RA e CD45RO, presentes em células *naive* (não estimuladas) e células T de memória, respectivamente, o resultado mais significativo foi a maior porcentagem de células T CD4⁺ expressando o marcador CD45RO nos pacientes com diagnóstico de HAI. Para este resultado, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo HAI e os demais grupos de pacientes sendo $p=0.030$ (IC -10.5 a -0.2) entre HAI e HAI associada a colangite e $p=0.041$ (IC -12.4 a 0.3) entre HAI e CEP. Esse resultado é apresentado na Figura 3.

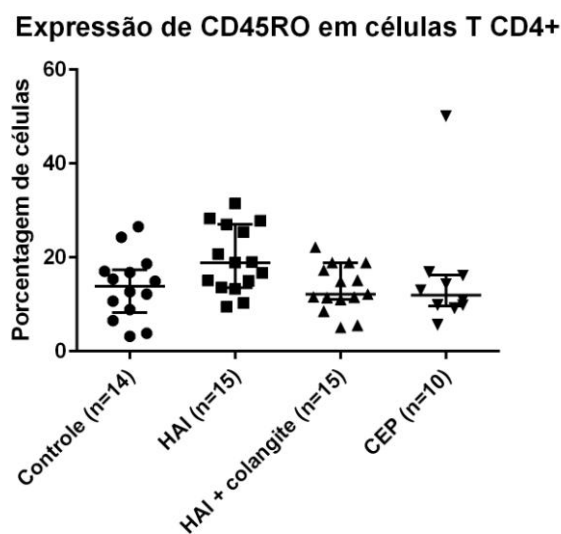


Figura 3: Expressão de CD45RO em células T CD4⁺ em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75.

Na avaliação da expressão dos marcadores CD25, CTLA-4, CD95L, CD69, CD40L em células T CD4⁺ o grupo de pacientes com diagnóstico de CEP apresentou maior porcentagem de expressão não só quando comparado ao grupo controle, mas também quando comparado aos grupos de pacientes com HAI e HAI associada à colangite. Para CD25 houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, sendo $p=0.024$ (IC -2.4 a -0.2) para HAI comparado à CEP e $p=0.031$ (IC 0.1 a 2.0) para HAI associada à colangite comparado à CEP. Na avaliação do CD95L, o p foi 0.058 (IC -1.5 a 0.2) para HAI comparada à CEP e $p=0.098$ (IC -1.4 a 0.4) para HAI associada à colangite comparada à CEP. Para CTLA-4, os resultados foram $p=0.014$ (-3.8 a -0.3) para HAI comparado à CEP e $p=0.041$ (IC -3.5 a -0.3) para HAI associada à colangite comparada à CEP. Com relação ao CD40L houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HAI e CEP ($p=0.030$; IC -1.7 a -0.2), mas não houve entre

HAI associada à colangite e CEP ($p=0.390$; IC -1.7 a 0.5). Achado semelhante ocorreu para CD69, com $p=0.034$ (IC 0.1 a 5.3) para HAI em comparação à CEP e $p=0.158$ (IC -0.2 a 5.2) para HAI associada à colangite comparada à CEP. Esses resultados são apresentados nas figuras 4, 5 e 6.

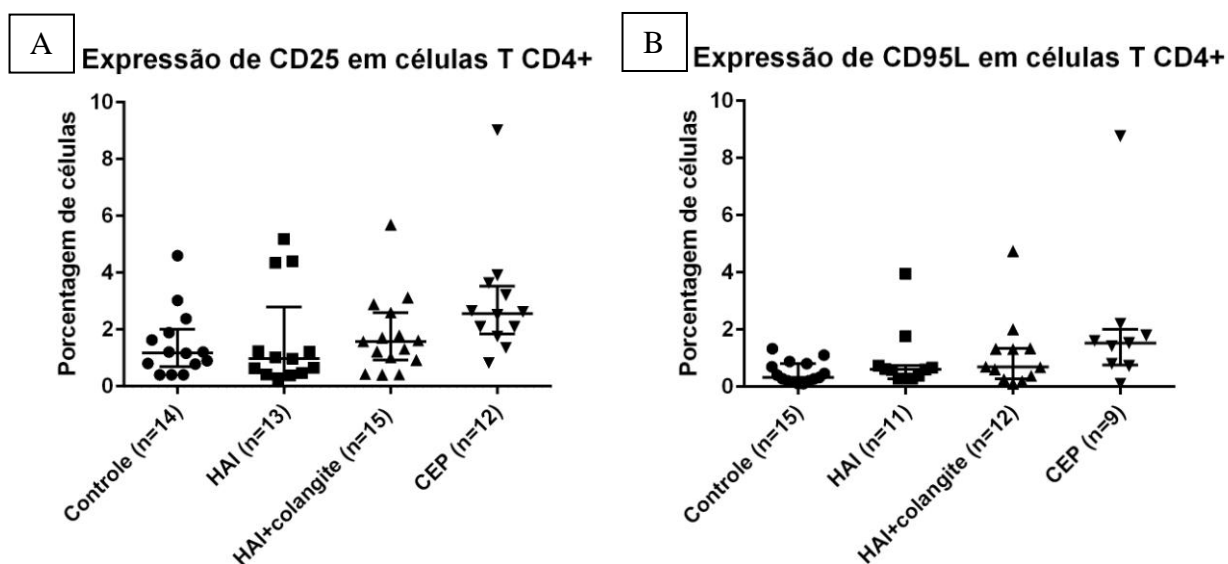


Figura 4: Expressão de CD25 em células T CD4⁺ em PBMC em A e expressão de CD95L em células T CD4⁺ em PBMC em B, em todos os grupos, com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75.

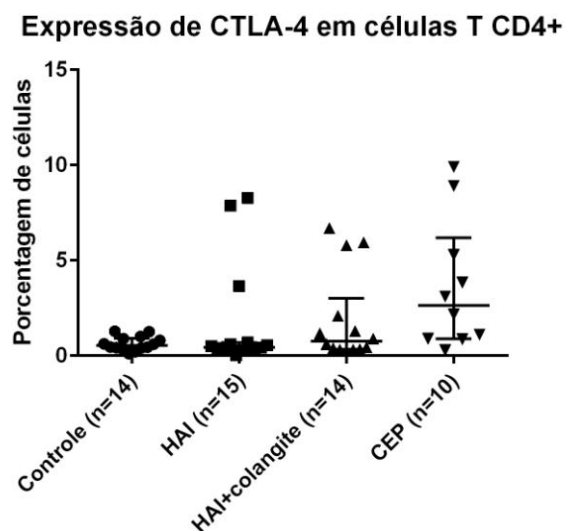


Figura 5: Expressão de CTLA-4 em células T CD4⁺ em PBMC em todos os grupos com representação mediana e intervalo interquartil 25-75.

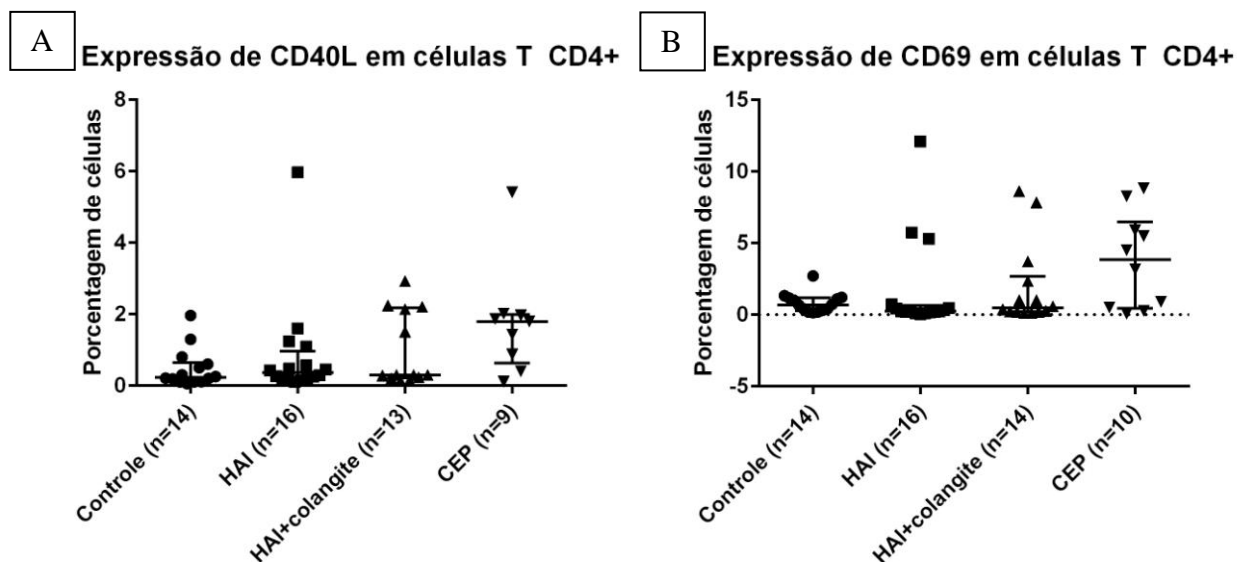


Figura 6: Expressão de CD40L em células T CD4⁺ em PBMC em A e expressão de CD69 em células T CD8⁺ em PBMC em B, em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75.

Na avaliação de monócitos, foi encontrada menor expressão de HLA-DR nos pacientes com diagnóstico de HAI e HAI associada à colangite quando comparados aos grupos CEP e controle ($p=0.003$). Esse resultado é apresentado na figura 7.

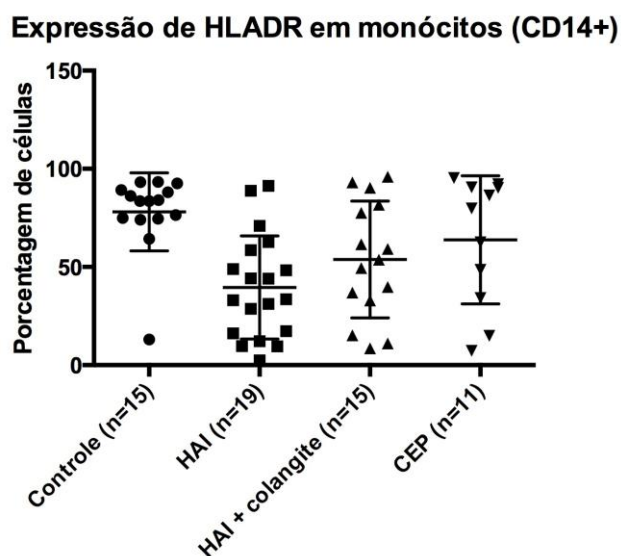


Figura 7: Expressão de HLA-DR em células CD14⁺ (monócitos) em PBMC em todos os grupos com representação de mediana e intervalo interquartil 25-75.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos de pacientes para os demais marcadores avaliados. (dados não mostrados).

Discussão

Considerando os resultados dos quatro grupos aqui apresentados, foi evidenciada uma diferença importante com relação aos marcadores de superfície celular entre os grupos com diagnóstico de HAI e o grupo com diagnóstico de CEP. Acreditamos que podemos extrair hipóteses importantes dessa análise. Primeiramente, foi possível confirmar os dados já disponíveis na literatura da importante atuação das células T CD4⁺, principalmente as regulatórias, na fisiopatologia de todas as doenças avaliadas, considerando que os principais achados ocorreram neste grupo celular.⁷⁻¹² CCR3 também mostrou ser um marcador importante nas três doenças avaliadas, podendo representar possível mecanismo compartilhado entre as mesmas, já que tem função relacionada a estímulo inflamatório e já foi descrito em outras com achados de autoimunidade, como por exemplo, retocolite ulcerativa.^{13,14}

Em segundo lugar, considerando o fato de que a hepatite autoimune apresenta, em geral, boa resposta ao tratamento com imunossupressores, enquanto a CEP não apresenta esse mesmo perfil de resposta, é possível que as diferenças apresentadas com relação aos marcadores celulares representem diferentes mecanismo imunopatológicos para estas doenças, que justificam essa diferente resposta ao tratamento.¹⁵ Os pacientes com diagnóstico de CEP apresentaram maior número de marcadores relacionados a mecanismos autoimunes sendo mais expressos em células T CD4⁺, com diferença estatisticamente significativa de em relação ao controle e aos pacientes dos grupos com diagnóstico de HAI. Em nosso grupo isso foi ainda mais evidente considerando que os pacientes com HAI (isolada ou em associação à colangite autoimune) apresentavam boa resposta ao tratamento.

Foi possível confirmar também que a HAI, mesmo com boa resposta ao tratamento, ainda apresenta fatores inflamatórios ativos, principalmente aqueles relacionados às células reguladoras e de memória imunológica (CD4⁺CD45RO⁺) como outros estudos já haviam previamente demonstrado.¹⁶ Consideramos este achado importante, porque demonstra uma possível diferença entre a HAI e a CEP, sendo que na primeira uma maior conversão de células T CD4⁺CD45RO⁻ T (*naive*) em células T CD4⁺CD45RO⁺ (*primed*) é descrita como um possível mecanismo autoimune. Esse achado indica a persistência e a ativação crônicas dos linfócitos T CD4⁺.¹⁶

Por outro lado, a CEP apresenta vários possíveis marcadores envolvidos em sua fisiopatologia como CTLA-4, CD40L e CD69, sendo necessários mais estudos para avaliar a importância e a forma de participação de cada um deles. Estes marcadores

podem representar até mesmo novas vias para tratamento, considerando novos medicamentos que estão sendo estudados.¹⁷⁻²¹

Por fim, na avaliação de células CD14⁺ (monócitos), chamou atenção a menor expressão de HLA-DR nos grupos HAI e HAI associada à colangite quando comparados não só ao controle, mas também ao grupo CEP. Tendo em vista a participação desse marcador como fator genético comprovadamente associado a essas doenças, esse achado, já relado por Longhi *et al*²² ao avaliar monócitos de crianças e adultos jovens com diagnóstico de HAI e Hiasa *et al*²³ em células dendríticas de adultos com HAI e cirrose biliar primária, pode representar a existência de um fenótipo mal funcionante do HLA-DR que tenha importância no mecanismo autoimune da HAI.

Conclui-se que, na casuística aqui apresentada, os pacientes com HAI, mesmo em sua associação à colangite, apresentaram diferenças importantes com relação à expressão de marcadores de superfície celular de linfócitos e monócitos quando comparados ao grupo com diagnóstico de CEP. Hipotetiza-se que as diferenças observadas possam advir de diferenças reais no mecanismo fisiopatológico das duas doenças, colocando a colangite autoimune como um quadro possivelmente mais ligado à hepatite autoimune e menos semelhante à colangite esclerosante primária, como é proposto na literatura voltada para a faixa etária pediátrica. Por outro lado, consideramos também que essas diferenças em nossa avaliação possam representar o efeito do tratamento imunossupressor, considerando o fato que os pacientes com diagnóstico de HAI apresentavam boa resposta ao mesmo. Acreditamos que novos estudos, possivelmente com casuísticas maiores e com pacientes em atividade da doença possam ser o caminho para elucidar esses achados.

Referências

1. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, *et al*. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 158-164.
2. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children: what is different from adult AIH? *Semin Liver Dis* 2009; 29: 297-306.

3. Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2013; 382:1587-99.
4. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, *et al.* International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938.
5. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48(1):169-176.
6. Torres KCL, Antonelli LRV, Souza ALS, Teixeira MM, Dutra WO, Gollob KJ. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. *Journal of Neuroimmunology* 2005; 166:144 – 157.
7. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, *et al.* Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176: 4484-4491.
8. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67.
9. Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, *et al.* A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 52: 999-1007.
10. Snook JA, Chapman RW, Sachdev GK, Heryet A, Kelly PM, Fleming KA, Jewell DP. Peripheral blood and portal tract lymphocytes populations in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1989; 9:36-41.
11. Panasiuk A, Prokopowicz D, Zak J, Panasiuk B, Wysocka J. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood in primary sclerosing cholangitis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1289–1291.
12. Kekilli M, Tunc B, Beyazit Y, Kurt M, Onal IK, Ulker A, *et al.* Circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the pathobiology of ulcerative colitis and concurrent primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci* 2013; 58(5):1250-5.
13. Landi A, Weismuller TJ, Lankisch TO, Santer DM, Tyrrell DL, Manns MP, *et al.* Differential serum levels of eosinophilic eotaxins in primary sclerosing cholangitis, primary biliary cirrhosis, and autoimmune hepatitis. *J Interferon Cytokine Res* 2014; 34:204–14.

14. Manousou P, Kolios G, Valatas V, Drygiannakis I, Bourikas L, Pyrovolaki K, *et al.* Increased expression of chemokine receptor CCR3 and its ligands in ulcerative colitis: the role of colonic epithelial cells in *in vitro* studies. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(2):337-47.
15. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, González-Peralta P, Kelly D, Mohan N, Shah U, Murray KF. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, 49:158-164.
16. Ogawa S, Sakaguchi K, Takaki A, Shiraga K, Sawayama T, Mouri H, *et al.* Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 69-75.
17. Pease JE, Horuk R. Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Expert Opin Drug Discov* 2001;9(5):467-83.
18. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med* 2013; 19(10):625-32.
19. Xie JH, Yamniuk AP, Borowski V, Kuhn R, Susulic V, Rex-Rabe S, *et al.* Engineering of a novel anti-CD40L domain antibody for treatment of autoimmune diseases. *J Immunol* 2014; 192(9):4083-92.
20. Tanaka H, Yang GX, Iwakoshi N, Knechtle SJ, Kawata K, Tsuneyama K, *et al.* Anti-CD40 ligand monoclonal antibody delays the progression of murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol* 2013; 174(3):364-71.
21. Law CL, Grewal IS. Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges. *Adv Exp Med Biol* 2009; 647:8-36.
22. Longhi MS, Mitry RR, Samyn M, Scalori A, Hussain MJ, Quaglia A, *et al.* Vigorous activation of monocytes in juvenile autoimmune liver disease escapes the control of regulatory T-cells. *Hepatology* 2009; 50(1): 130-142.
23. Hiasa Y, Akbar SM, Abe M, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases; decrease expression of HLA-DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepatol Res* 2002; 22(4): 241-249.

6 – Comentários Finais

Apesar das várias hipóteses existentes, ainda não foi possível comprovar ao certo o mecanismo fisiopatológico envolvido em várias doenças com fatores autoimunes. Tendo em vista o pequeno número de estudos existentes sobre a fisiopatologia das doenças aqui avaliadas, principalmente quando tratamos da faixa etária pediátrica, e que parte dos dados aqui relatados são similares a outros dados já disponíveis na literatura, acreditamos que esses resultados possam contribuir para esse esclarecimento, fomentando também pesquisas semelhantes. Além disso, os achados inovadores, ou seja, ainda não relatados na literatura podem contribuir trazendo novos caminhos na busca desse conhecimento. Acreditamos ainda que a avaliação comparativa dos fatores imunofenotípicos entre a hepatite autoimune e colangite esclerosante primária pode nos ajudar a conhecer melhor a inter-relação entre essas doenças, principalmente considerando importante o fato de que em crianças observamos de forma mais frequente a associação de achados da HAI associados a achados de alterações em vias biliares.

Nosso trabalho apresentou algumas limitações, sendo a primeira delas o menor número de pacientes avaliados no grupo da colangite esclerosante primária. Tal número se justifica pela raridade da doença na faixa etária pediátrica. Tendo em vista os achados relevantes aqui descritos não acreditamos que esse fato diminua a importância desse estudo. Colocamos ainda como limitação o fato de, durante as avaliações de citometria, o número de pacientes em cada grupo ser pequeno para alguns marcadores. As dificuldades inerentes à metodologia justificam as perdas de amostras. Acreditamos mesmo assim na importância de se relatar os achados, considerando que a literatura apresenta trabalhos com resultados semelhantemente pequenos em citometria.

Sabemos ainda que com o número restrito de trabalhos nessa área, principalmente em pediatria, e também o fato de se tratam de doenças raras, podem ser necessários vários estudos em diferentes casuísticas ou estudos maiores, multicêntricos, para que possam ser avaliados o real impacto desses dados no diagnóstico e tratamento das doenças e a sua repercussão em casos individuais.

Por fim, HAI e CEP, são doenças desafiantes para o paciente e a equipe que o atende. HAI e sua sobreposição à colangite demandam tratamento contínuo, com medicamentos que possuem efeitos colaterais significativos e podem evoluir para quadro grave e irreversível com indicação de transplante quando não tratadas

adequadamente. A situação da CEP é ainda mais complicada, pois não possui tratamento que altere o curso da doença. Dessa forma, todas as contribuições para esclarecer o mecanismo envolvido na fisiopatologia devem ser consideradas importantes, pois ajudam a elucidar novas vias para diagnóstico e/ou tratamento, podendo diminuir a morbi-mortalidade dos pacientes.

ANEXO A

Tabela A: Médias e desvios padrões das porcentagens de expressão dos marcadores analisados nos grupos controle, HAI, HAI associada à colangite autoimune e CEP.

Média e desvio padrão das porcentagens de expressão dos marcadores nos grupos				
Marcador e tipo celular	Controle	HAI	HAI + colangite	CEP
CCR3 em T CD4+	1.6 ± 0.88	25,2 ± 27.2	16.3 ± 16.9	20,9 ± 18.9
CCR5 em T CD4+	3.2 ± 2.3	2.4 ± 2.2	5.7 ± 3.8	4.6 ± 1.9
CD45RA em T CD4+	19.2 ± 8.4	26.1 ± 14.1	30.5 ± 12.4	27.2 ± 15.6
CD45RO em T CD4+	13.7 ± 6.9	19.5 ± 7.0	13.5 ± 5.0	11.1 ± 4.0
CD25 em T CD4+	1.5 ± 1.2	1.6 ± 1.7	1.8 ± 1.4	2.9 ± 2.1
CD28 em T CD4+	39.4 ± 6.0	47.0 ± 19.4	46.6 ± 14.7	38.6 ± 19.2
CD28 ^{NEG} em T CD4+	1.7 ± 1.3	2.3 ± 3.1	2.2 ± 1.7	3.4 ± 2.0
CTLA-4 em T CD4+	0.6 ± 0.4	1.6 ± 2.7	1.9 ± 2.4	3.6 ± 3.4
CD95 em T CD4+	14.5 ± 5.1	16.5 ± 7.6	15.0 ± 7.0	15.2 ± 5.8
CD95L em T CD4+	0.5 ± 0.4	0.9 ± 1.0	1.1 ± 1.3	1.7 ± 1.6
CD69 em T CD4+	0.8 ± 0.7	1.7 ± 3.3	1.9 ± 2.9	3.8 ± 3.3
CD40L em T CD4+	0.5 ± 0.4	0.8 ± 1.4	0.9 ± 1.0	1.8 ± 1.5
HLA-DR em T CD4+	1.6 ± 0.6	2.8 ± 3.5	3.3 ± 2.8	5.1 ± 3.4
CD4 total em PBMC*	38.5 ± 10.0	52.5 ± 12.9	48.8 ± 14.9	45.4 ± 17.4
CCR3 em T CD8+	0.6 ± 0.3	1.6 ± 1.3	2.0 ± 2.6	1.7 ± 0.9
CCR5 em T CD8+	2.2 ± 2.4	1.3 ± 1.4	2.1 ± 2.1	1.8 ± 1.7
CD45RA em T CD8+	14.0 ± 6.3	19.3 ± 5.3	21.9 ± 8.5	19.1 ± 5.4
CD45RO em T CD8+	7.7 ± 7.2	4.5 ± 6.1	2.7 ± 2.8	3.7 ± 2.5
CD25 em T CD8+	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.5	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.2
CD28 em T CD8+	19.8 ± 13.84	18.6 ± 12.34	14.9 ± 7.9	13.0 ± 6.2
CD28 ^{NEG} em T CD8+	5.2 ± 5.1	4.4 ± 3.2	3.6 ± 1.7	4.8 ± 3.1
CTLA-4 em T CD8+	0.5 ± 0.5	1.0 ± 2.1	1.4 ± 2.3	1.2 ± 1.8
CD95 em T CD8+	5.9 ± 5.2	6.1 ± 8.4	5.0 ± 4.8	6.9 ± 4.9
CD95L em T CD8+	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.8 ± 1.0	0.9 ± 0.6
CD69 em T CD8+	0.5 ± 0.3	1.3 ± 1.8	1.5 ± 2.2	1.7 ± 1.9
CD40L em T CD8+	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.3 ± 0.2
HLA-DR em T CD8+	3.2 ± 2.5	1.6 ± 1.2	3.4 ± 3.4	2.5 ± 1.3
CD8 total em PBMC*	19.4 ± 9.5	23.1 ± 11.7	20.5 ± 8.7	20.5 ± 14.0

Média e desvio padrão das porcentagens de expressão dos marcadores nos grupos				
Marcador e tipo celular	Controle	HAI	HAI + colangite	CEP
HLA-DR em CD14+	78.0 ± 19.8	39.5 ± 26.3	53.8 ± 29.7	63.8 ± 32.6
CD80 em CD14+	1.5 ± 1.3	3.7 ± 10.6	3.0 ± 2.7	3.4 ± 2.3
CD86 em CD14+	42.8 ± 55.3	-	-	42.5 ± 40.7
CD14 total em PBMC*	79.2 ± 18.8	57.9 ± 26.1	73.3 ± 15.7	68.7 ± 27.1

*PBMC: peripheral blood mononuclear cells

ANEXO B**TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS
HEPATITE AUTOIMUNE**

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo:

Data:

Convite para participar do estudo

Seu filho(a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite auto-imune. O motivo da pesquisa é para podermos saber melhor sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento, quais são as complicações que seu filho já sentiu ou sente usando os remédios.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer sobre a hepatite autoimune nas crianças e adolescentes, através de um levantamento sobre as formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados laboratoriais e aspectos que levam a lesão do fígado. Avaliar a evolução clínica após tratamento e suas complicações no Setor de Hepatologia do serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, verificando a resposta e recaídas durante o tratamento. Avaliar a evolução do crescimento e desenvolvimento dos pacientes ao longo do tratamento.

Seus direitos

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você e seu filho(a) são atendidos e acompanhados neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que o acompanhamento continuará por tempo indeterminado. Você e seu filho(a) continuarão recebendo a mesma atenção que já recebem. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a disponibilidade do seu filho(a) em participar do estudo.

Procedimento

A participação do seu filho neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina já realizados estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o nome de seu filho(a) ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu filho(a) continue a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que seu filho corre seriam os relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório, que são os mesmos atuais quando colhe exames de sangue como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por seu filho(a) estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da hepatite autoimune. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela participação do seu filho(a) neste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações não será identificada o nome de seu filho(a) que só será conhecido pelos pesquisadores. O nome de seu filho(a) não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo. Nenhuma informação obtida desta pesquisa será incluída no histórico médico do paciente.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os direitos de seu filho(a) como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-88749235). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você desejar discutir o estudo ou os direitos do seu filho(a) na pesquisa com alguém que não está associado com o projeto proposto, você poderá entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome de indivíduo: _____

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____, _____, responsável legal por _____,

RG N° _____ concordo com a participação dele como voluntário no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura dos pais ou responsáveis

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o pai ou responsável, mencionado acima, a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Ass. da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31)8874 9235

Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982)

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE ESCLARECIMENTO HEPATITE AUTOIMUNE

SUBGRUPO FAIXA ETÁRIA 7 A 12 ANOS – (PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS E CRIANÇA)

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo: _____
Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Você está recebendo um convite para participar de um projeto de pesquisa em crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite autoimune. O motivo da pesquisa é para podermos saber melhor sobre a doença e mostrar aos outros médicos se o tratamento e os remédios usados estão sendo bons ou não, quais são os problemas que podem acontecer com os pacientes que usam esses medicamentos.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer sobre a hepatite autoimune nas crianças e adolescentes, estudando o que acontece na doença, o que você sente, quais as mudanças que podem acontecer no seu corpo, o que pode estar anormal no exame de sangue, o que causa a lesão no fígado. Avaliar ao que mudou em você e nos seus exames após tratamento, por exemplo, se você cresceu, ganhou peso, quais os problemas que podem acontecer com o tratamento. O estudo será feito no Setor de Hepatologia do serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG.

Seus direitos

Você vai participar deste estudo se você quiser. Se quiser ou não participar da pesquisa, você será atendido e acompanhado no ambulatório da mesma forma, vai receber a mesma atenção que já recebe. Se um dia você não quiser fazer parte do estudo, pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982). Você será informado de qualquer achado novo encontrado durante do desenvolvimento deste projeto que possa impedir que você participe do estudo.

Procedimento

A sua participação na pesquisa inclui a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão avaliados os dados clínicos, os resultados do laboratório e os da biópsia do fígado. Durante a coleta de sangue, para os exames de rotina já realizados, estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o seu nome ou o seu registro no hospital será mostrado.

Se depois de permitir a coleta, se você não quiser continuar participando do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer época do estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que você tem neste estudo são relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório, que são os mesmos que você faz quando colhe exames de sangue, por exemplo, durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum prêmio ou presente para você participar deste estudo, mas sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo o tratamento da hepatite autoimune. A importância da pesquisa é para podermos mostrar aos outros médicos como é realizado o tratamento, quais os problemas que podem acontecer. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Você não vai gastar nenhum dinheiro para participar desse estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos sem gasto para você.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais ficarão em segredo. Em todas as anotações seu nome não vai aparecer, somente os pesquisadores irão saber. O seu nome não será usado em nenhum relatório ou publicação neste estudo. Nenhuma informação adquirida nesta pesquisa será usada no histórico médico do paciente.

Questões

Você pode fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre seu direito como participante. Se tiver outras perguntas ou dúvidas mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-88749235). Se em qualquer período, durante ou depois da pesquisa, você quiser tirar alguma dúvida do estudo ou dos direitos que você tem na pesquisa, com alguém que não faz parte desse projeto, você poderá conversar com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome de indivíduo: _____

Eu recebi as informações sobre o significado e a importância de realizar essa pesquisa, quais exames serão feitos e quais os riscos e benefícios que poderão acontecer durante o estudo. As minhas dúvidas e perguntas foram respondidas pelo pesquisador e/ou médico responsável pela pesquisa.

Eu, _____, RG N° _____
responsável legal por _____

RG N° _____, concordo com a minha participação como voluntário no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ___/___/___
Assinatura dos pais ou responsável

_____ Data: ___/___/___
Assinatura da criança

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o indivíduo mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei ao indivíduo se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Responsável

Ass. da Pesquisadora: _____

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira : (31)8874 9235
Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982)

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE ESCLARECIMENTO HEPATITE AUTOIMUNE

SUBGRUPO FAIXA ETÁRIA 13 A 17 ANOS

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Você está sendo convidado a participar como convidado de um projeto de pesquisa de crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite auto-imune. O motivo da pesquisa é para podermos saber melhor sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento, quais são as complicações que você já sentiu ou sente usando os remédios.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer sobre a hepatite autoimune nas crianças e adolescentes, através de um levantamento sobre as formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados laboratoriais e aspectos que levam a lesão do fígado. Avaliar a evolução clínica após tratamento e suas complicações no Setor de Hepatologia do serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, verificando a resposta e recaídas durante o tratamento. Avaliar a evolução do crescimento e desenvolvimento dos pacientes ao longo do tratamento.

Seus direitos

A sua participação neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você é atendido e acompanhado neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que seu acompanhamento continuará por tempo indeterminado. Você continuará recebendo a mesma atenção que já recebe. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a sua disponibilidade em participar do estudo.

Procedimento

A sua participação neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o seu nome ou o seu registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, você não quiser continuar participando do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que você corre seriam os relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório, que são os mesmos atuais quando colhe exames de sangue como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da hepatite autoimune. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela sua participação. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações você não será identificado e seu nome só será conhecido pelos pesquisadores. O seu nome não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo. Nenhuma informação obtida desta pesquisa será incluída no histórico médico do paciente.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-88749235). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você desejar discutir o estudo ou os seus direitos na pesquisa com alguém que não está associado com o projeto proposto, você poderá entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome de indivíduo:

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG _____ N° _____,

concordo com a minha participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a minha participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

Assinatura do Paciente

Data: ___/___/___

Assinatura dos pais ou responsável

Data: ___/___/___

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o indivíduo mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei ao indivíduo se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ___/___/___
Assinatura do Pesquisador Responsável
Ass. da Pesquisadora: _____

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira : (31)8874 9235
Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982)

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE ESCLARECIMENTO HEPATITE AUTOIMUNE (SUBGRUPO PACIENTES ACIMA DE 18 ANOS)

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo: _____
Data: ____/____/____

Convite para participar do estudo

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico de hepatite auto-imune. Apesar de atualmente você já ter atingido a idade adulta, o seu diagnóstico foi durante a fase de criança ou adolescência, período de inclusão no estudo. O motivo da pesquisa é para podermos saber melhor sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento, quais são as complicações que você já sentiu ou sente usando os remédios.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer sobre a hepatite autoimune nas crianças e adolescentes, através de um levantamento sobre as formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados laboratoriais e aspectos que levam a lesão do fígado. Avaliar a evolução clínica após tratamento e suas complicações no Setor de Hepatologia do serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, verificando a resposta e recaídas durante o tratamento. Avaliar a evolução do crescimento e desenvolvimento dos pacientes ao longo do tratamento.

Seus direitos

A sua participação neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você é atendido (a) e acompanhada neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que o acompanhamento, continuará por tempo indeterminado. Você continuará recebendo a mesma atenção que já recebe. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a disponibilidade em participar do estudo.

Procedimento

A sua participação neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina já realizados estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o seu nome ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, e você não quiser continuar a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que corre seriam os relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório, que são os mesmos atuais quando colhe exames de sangue como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto de estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da hepatite autoimune. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela participação neste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações não será identificada o seu nome que só será conhecido pelos pesquisadores. O seu nome não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo. Nenhuma informação obtida desta pesquisa será incluída no histórico médico do paciente.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-88749235) ou Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-88749235). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você desejar discutir o estudo ou os seus direitos na pesquisa com alguém que não está associado com o projeto proposto, você poderá entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA

Título: HEPATITE AUTOIMUNE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome de indivíduo:

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG Nº _____ concordo com a participação dele, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ___/___/___
Assinatura do paciente

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o paciente mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ___/___/___
Assinatura do Pesquisador Responsável
Ass. da Pesquisadora: _____

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31)8874 9235
Dra. Eleonora Fagundes Druve (31-99595982)

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE ESCLARECIMENTO COLANGITE ESCLEROSSANTE PRIMÁRIA PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS

(para responsáveis por participantes de até 6 anos, para responsáveis por participantes de 13 a 17 anos)

Título: COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA

DRA. ELEONORA DRUVE TAVARES FAGUNDES

Nome do Indivíduo:

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Seu filho(a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico de colangite esclerosante primária. O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer a doença nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você e seu filho(a) são atendidos e acompanhados neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que o acompanhamento continuará por tempo indeterminado. Você e seu filho(a) continuarão recebendo a mesma atenção que já recebem. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-9959-5982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a disponibilidade do seu filho(a) em participar do estudo.

Procedimento

A participação do seu filho neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório e de imagem e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina já realizados estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o nome de seu filho(a) ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu filho(a) continue a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos para o seu filho estão relacionados à coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por seu filho(a) estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da colangite esclerosante. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela participação do seu filho(a) neste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações não será identificada o nome de seu filho(a) que só será conhecido pelos pesquisadores. O nome de seu filho(a) não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os direitos de seu filho(a) como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-9959-5982). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você ou seu filho tiverem dúvidas relacionadas as questões éticas, vocês poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____, responsável legal por _____, RG N° _____ concordo com a participação dele como voluntário no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura dos pais ou responsáveis

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o pai ou responsável, mencionado acima, a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos à disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235
Prof. Eleonora Druve Fagundes (31) 9959-5982

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br
Telefone 3409-4592

**TERMO DE ESCLARECIMENTO COLANGITE ESCLEROSSANTE
PRIMÁRIA
SUBGRUPO FAIXA ETÁRIA 7 A 12 ANOS
(para pais e responsáveis e a criança)**

Título: COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA

DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Seu filho(a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico de colangite esclerosante primária. O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer a doença nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você e seu filho(a) são atendidos e acompanhados neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que o acompanhamento continuará por tempo indeterminado. Você e seu filho(a) continuarão recebendo a mesma atenção que já recebem. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-9959-5982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a disponibilidade do seu filho(a) em participar do estudo.

Procedimento

A participação do seu filho neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório, de imagem e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina já realizados estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o nome de seu filho(a) ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu filho(a) continue a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos para o seu filho estão relacionados à coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por seu filho(a) estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da colangite esclerosante. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela participação do seu filho(a) neste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações não será identificada o nome de seu filho(a) que só será conhecido pelos pesquisadores. O nome de seu filho(a) não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os direitos de seu filho(a) como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-9959-5982). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você ou seu filho tiverem dúvidas relacionadas as questões éticas, vocês poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____, responsável legal por _____, RG N° _____ concordo com a participação dele como voluntário no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura dos pais ou responsáveis

_____ Data: ____/____/____
Assinatura da criança

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o pai ou responsável, mencionado acima, a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235
Profa. Eleonora Druve Fagundes (31) 9959-5982)

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br
Telefone 3409-4592

**TERMO DE ESCLARECIMENTO COLANGITE ESCLEROSSANTE
PRIMÁRIA
SUBGRUPO FAIXA ETÁRIA 13 A 17 ANOS**

Título: COLANGITE ESCLEROSSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA

DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa de crianças e adolescentes com diagnóstico de colangite esclerosante primária. O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer a doença nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A sua participação neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você é atendido e acompanhado neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que seu acompanhamento continuará por tempo indeterminado. Você continuará recebendo a mesma atenção que já recebe. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-9959-5982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a sua disponibilidade em participar do estudo.

Procedimento

A sua participação neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o seu nome ou o seu registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, você não quiser continuar participando do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que você corre estão relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da colangite esclerosante primária. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela sua participação. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações você não será identificado e seu nome só será conhecido pelos pesquisadores. O seu nome não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-8874-9235). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você tiver dúvidas relacionadas as questões éticas, você

poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____,

concordo com a minha participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a minha participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Paciente

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o indivíduo mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei ao indivíduo se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

_____ Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235
Profa. Eleonora Druve Fagundes (31) 9959-5982

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br
Telefone 3409-4592

**TERMO DE ESCLARECIMENTO COLANGITE ESCLEROSSANTE
PRIMÁRIA
PARA MAIORES DE 18 ANOS**

Título: COLANGITE ESCLEROSSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA

DRA. ELEONORA DRUVE FAGUNDES

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa de crianças e adolescentes com diagnóstico de colangite esclerosante primária. O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer a doença nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A sua participação neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você é atendido e acompanhado neste ambulatório. Não haverá nenhuma modificação na forma das consultas nem do tratamento, sendo que seu acompanhamento continuará por tempo indeterminado. Você continuará recebendo a mesma atenção que já recebe. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-9959-5982). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a sua disponibilidade em participar do estudo.

Procedimento

A sua participação neste estudo envolverá a coleta dos dados de prontuário do seu atendimento realizado ao longo do acompanhamento neste hospital. Serão analisados os dados clínicos, os resultados do laboratório e os da biópsia hepática. Durante a coleta de sangue para os exames de rotina estaremos coletando parte do sangue para avaliar substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o seu nome ou o seu registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, você não quiser continuar participando do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que você corre estão relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento da colangite esclerosante primária. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela sua participação. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações você não será identificado e seu nome só será conhecido pelos pesquisadores. O seu nome não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Eleonora Druve Fagundes (31-8874-9235). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você tiver dúvidas relacionadas as questões éticas, você

poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____,

concordo com a minha participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a minha participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Paciente

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o indivíduo mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei ao indivíduo se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

_____ Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235
Profa. Eleonora Druve Fagundes (31) 9959-5982

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br
Telefone 3409-4592

PARTICIPANTES DO GRUPO CONTROLE

TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS

(para responsáveis por participantes de até 6 anos, para responsáveis por participantes de 13 a 17 anos)

Título: HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. PRISCILA MENEZES FERRI LIU

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Seu filho(a) está sendo convidado a participar como grupo controle (grupo de crianças que não tem a doença em estudo) de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico doenças hepáticas autoimunes (hepatite autoimune e colangite esclerosante primária). O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer as doenças nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você e seu filho(a) são atendidos e acompanhados nos ambulatórios. Você e seu filho(a) continuarão recebendo a mesma atenção que já recebem. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Priscila Menezes Ferri Liu (31-9132-4248). Você será informado de qualquer alteração encontrada que possa ser importante para a saúde de seu filho (a)

Procedimento

A participação do seu filho neste estudo envolverá a coleta de sangue para avaliação de substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o nome de seu filho(a) ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu filho(a) continue a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos para o seu filho estão relacionados à coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por seu filho(a) estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento das doenças em estudo. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar estas doenças de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela participação do seu filho(a) neste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações não será identificada o nome de seu filho(a) que só será conhecido pelos pesquisadores. O nome de seu filho(a) não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os direitos de seu filho(a) como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Priscila Menezes Ferri Liu (31-9132-4248). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você ou seu filho tiverem dúvidas relacionadas as questões éticas, vocês poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____, responsável legal por _____, RG N° _____ concordo com a participação dele como voluntário no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura dos pais ou responsáveis

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o pai ou responsável, mencionado acima, a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos à disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235
Profa. Priscila Menezes Ferri Liu (31) 9132-4248

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br
Telefone 3409-4592

**TERMO DE ESCLARECIMENTO PARTICIPANTES DO GRUPO CONTROLE
SUBGRUPO FAIXA ETÁRIA 7 A 12 ANOS**
(para pais e responsáveis e a criança)

Título: HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. PRISCILA MENEZES FERRI LIU

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Seu filho(a) está sendo convidado a participar como grupo controle (grupo de crianças que não tem a doença em estudo) de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico doenças hepáticas autoimunes (hepatite autoimune e colangite esclerosante primária). O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer as doenças nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A participação de seu filho(a) neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você e seu filho(a) são atendidos e acompanhados nos ambulatórios. Você e seu filho(a) continuarão recebendo a mesma atenção que já recebem. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Priscila Menezes Ferri Liu (31-9132-4248). Você será informado de qualquer alteração encontrada que possa ser importante para a saúde de seu filho (a).

Procedimento

A participação do seu filho neste estudo envolverá a coleta de sangue para avaliação de substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa o nome de seu filho(a) ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu filho(a) continue a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos para o seu filho estão relacionados à coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por seu filho(a) estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento das doenças em estudo. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar estas doenças de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela participação do seu filho(a) neste estudo. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações não será identificada o nome de seu filho(a) que só será

conhecido pelos pesquisadores. O nome de seu filho(a) não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os direitos de seu filho(a) como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Priscila Menezes Ferri Liu (31-9132-4248). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você ou seu filho tiverem dúvidas relacionadas as questões éticas, vocês poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG N° _____, responsável legal por _____, RG N° _____ concordo com a participação dele como voluntário no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura dos pais ou responsáveis

_____ Data: ____/____/____
Assinatura da criança

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o pai ou responsável, mencionado acima, a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos
Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235
Profa. Eleonora Druve Fagundes (31) 9959-5982

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br
Telefone 3409-4592

TERMO DE ESCLARECIMENTO PARTICIPANTES DO GRUPO CONTROLE SUBGRUPO FAIXA ETÁRIA 13 A 17 ANOS

Título: HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS, CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS E RESPOSTA AO TRATAMENTO.

INVESTIGADORES: DR. ALEXANDRE RODRIGUES FERREIRA
DRA. PRISCILA MENEZES FERRI LIU

Nome do Indivíduo: _____

Data: ___/___/___

Convite para participar do estudo

Você está sendo convidado a participar como grupo controle (grupo de pacientes que não tem a doença em estudo) de um projeto de pesquisa das crianças e adolescentes com diagnóstico doenças hepáticas autoimunes (hepatite autoimune e colangite esclerosante primária). O objetivo da pesquisa é melhorar o conhecimento sobre a doença e descrever como tem sido a resposta aos remédios usados no tratamento.

Proposta de Pesquisa

O principal objetivo desta pesquisa é conhecer a doença nas crianças e adolescentes, suas formas de manifestação clínica (sinais, sintomas e alterações ao exame físico), achados dos exames complementares, resposta ao tratamento e complicações.

Seus direitos

A sua participação neste estudo é voluntária. A sua aceitação, ou não aceitação, de participar da pesquisa, não mudará em nada a forma que você é atendido e acompanhado neste ambulatório. Você continuará recebendo a mesma atenção que já recebe. Para se retirar do estudo você pode entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Priscila Menezes Ferri Liu (31-9132-4248). Você será informado de qualquer achado novo obtido durante do desenvolvimento deste projeto que possa afetar a sua disponibilidade em participar do estudo.

Procedimento

A sua participação neste estudo envolverá a coleta de sangue para avaliação de substâncias que possam estar envolvidas no processo de inflamação do fígado. Em nenhum momento da pesquisa seu nome ou o registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, você não quiser continuar a participar do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase de estudo, seja antes ou depois da coleta dos exames, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

Riscos

Os riscos que você corre estão relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório. Estes riscos são os mesmos quando se colhe exames de sangue para as consultas de acompanhamento, como dor durante a punção, sangramentos no local que é retirado o sangue.

Benefícios

Não haverá nenhum benefício direto por estar participando deste estudo. Entretanto sua participação deve nos ajudar a entender como está sendo a evolução e tratamento das doenças em estudo. A importância da pesquisa é para podermos mostrar a outros médicos como é realizado o tratamento, quais as suas complicações. Desta forma outros médicos poderão descobrir e tratar a doença de uma forma mais rápida.

Custos

Não haverá nenhum custo adicional pela sua participação. Os testes laboratoriais feitos para este projeto serão feitos todos gratuitamente.

Confidencialidade

As anotações sobre os exames clínicos e testes laboratoriais serão mantidos em segredo de acordo com a legislação atual. Em todas as anotações você não será identificado e seu nome só será conhecido pelos pesquisadores. O seu nome não será utilizado em nenhum relatório ou publicação neste estudo.

Questões

Sinta-se à vontade de fazer qualquer pergunta sobre este estudo ou sobre os seus direitos como participante do estudo. Se outras perguntas surgirem mais tarde, você poderá entrar em contato com o Dr. Alexandre Rodrigues Ferreira (31-8874-9235) ou Dra. Priscila Menezes Ferri Liu (31-9132-4248). Se em qualquer período, durante ou após a pesquisa, você tiver dúvidas relacionadas as questões éticas, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. O número do telefone de contato é (31)3409-4592. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, funciona no Campus da UFMG, na Unidade Administrativa II (prédio da Fundep), 2º andar, sala 2005.

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer foram explicados para mim. Eu também tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável e/ou médico responsável pelo estudo. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu, _____, RG _____ N° _____

concordo com a minha participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a minha participação no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data: ___/___/___
Assinatura do Paciente

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

O investigador principal explicou para o indivíduo mencionado acima a natureza e propósito dos procedimentos descritos acima e possíveis riscos, desconfortos e benefícios que podem ocorrer. Eu perguntei ao indivíduo se qualquer pergunta lhe ocorreu em relação aos procedimentos empregados e respondi essas perguntas da melhor forma possível.

_____ Data: ___/___/___
Assinatura do Pesquisador Responsável

Assinatura da Pesquisadora

Em caso de dúvida, estaremos a disposição para maiores esclarecimentos

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira: (31) 8874-9235

Profa. Eleonora Druve Fagundes (31) 9959-5982

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar sala 2005- Campus Pampulha,

Belo Horizonte, MG, 31270-901 - coep@prpq.ufmg.br

Telefone 3409-4592

ANEXO C**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP****Parecer nº. ETIC 0419.0.203.000-10****Interessado(a): Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de novembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Hepatite autoimune em crianças e adolescentes: estudo dos aspectos imunopatológicos, diagnósticos e resposta ao tratamento"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a faint, illegible stamp.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 17395313.0.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Eleonora Druve Tavares Fagundes
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de julho de 2013, o projeto de pesquisa intitulado **"Colangite esclerosante primária em crianças e adolescentes: estudo dos aspectos imunopatológicos, clínicos, diagnósticos e resposta ao tratamento"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amatal
Coordenadora do COEP-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA PRISCILA MENEZES FERRI LIU

Realizou-se, no dia 01 de março de 2016, às 14:00 horas, na sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada “**HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO DOS FATORES IMUNOFENOTÍPICOS**”, apresentada por **PRISCILA MENEZES FERRI LIU**, número de registro 2012655275, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Alexandre Rodrigues Ferreira - Orientador (UFMG), Maria do Carmo Barros de Melo (UFMG), Eleonora Druve Tavares Fagundes (UFMG), Karen Cecilia de Lima Torres Navarro (FIOCRUZ), Gabriel Hessel (Unicamp).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

08/03/2016
CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

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

Belo Horizonte, 01 de março de 2016.

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira – Orientador (Doutor)

Prof.^a Maria do Carmo Barros de Melo (Doutora)

Prof.^a Eleonora Druve Tavares Fagundes (Doutora)

Prof.^a Karen Cecilia de Lima Torres Navarro (Doutora)

Prof. Gabriel Hessel (Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE



FOLHA DE APROVAÇÃO

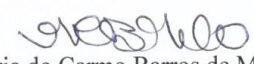
HEPATITE AUTOIMUNE E COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES: AVALIAÇÃO DOS FATORES IMUNOFENOTÍPICOS

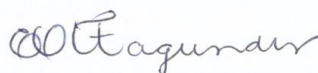
PRISCILA MENEZES FERRI LIU

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

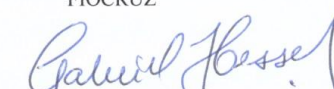
Aprovada em 01 de março de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira - Orientador
UFMG


Prof.^a Maria do Carmo Barros de Melo
UFMG


Prof.^a Eleonora Druve Tavares Fagundes
UFMG


Prof.^a Karen Cecilia de Lima Torres Navarro
FIOCRUZ


Prof. Gabriel Hessel
UNICAMP

Belo Horizonte, 1 de março de 2016.

L783h Liu, Priscila Menezes Ferri.
Hepatite autoimune e colangite esclerosante primária em crianças e adolescentes [manuscrito]: avaliação dos fatores imunofenotípicos. / Priscila Menezes Ferri Liu. -- Belo Horizonte: 2016.
158f.: il.
Orientador: Alexandre Rodrigues Ferreira.
Coorientador: Débora Marques de Miranda.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hepatite Autoimune. 2. Colangite Esclerosante. 3. Imunofetipagem. 4. Criança. 5. Adolescente. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Ferreira, Alexandre Rodrigues. II. Miranda, Débora Marques de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 715