

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG)
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Monique Ellen Gervásio Nunes

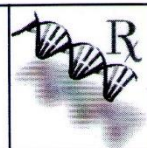
**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NO GENE *HLA DRB1* EM PACIENTES COM
HEPATITE AUTOIMUNE E SUAS COMPLICAÇÕES**

Belo Horizonte

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NO GENE HLA DRB1 EM PACIENTES COM
HEPATITE AUTOIMUNE E SUAS COMPLICAÇÕES**

MONIQUE ELLEN GERVÁSIO NUNES

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

Aprovada em 28 de março de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Debora Marques de Miranda - Orientador
UFMG

Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa
UFMG-INCT Medicina Molecular

Prof(a). Eleonora Druive Tavares Fagundes
UFMG

Prof(a). Renan Pedra de Souza
UFMG

Belo Horizonte, 28 de março de 2017.

MONIQUE ELLEN GERVÁSIO NUNES

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NO GENE *HLA DRB1* EM PACIENTES COM
HEPATITE AUTOIMUNE E SUAS COMPLICAÇÕES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre junto ao Programa de pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Marques de Miranda.

Co-orientadoras: Prof. Dra. Priscila Menezes Ferri Liu e Profa. Dra Daniela Valadão Freitas Rosa.

Belo Horizonte

2017

Nunes, Monique Ellen Gervásio.
N972a Análise dos polimorfismos no gene HLA DRB1 em pacientes com
hepatite autoimune e suas complicações [manuscrito]. / Monique Ellen
Gervásio Nunes. - - Belo Horizonte: 2017.
80f.
Orientador: Débora Marques de Miranda.
Coorientador: Priscila Menezes Ferri Liu; Daniela Valadão Freitas Rosa.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.
1. Hepatite Autoimune/complicações. 2. Colangite. 3. Cadeias HLA-
DRB1. 4. Polimorfismo Genético. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda,
Débora Marques de. II. Liu, Priscila Menezes Ferri. III. Rosa, Daniela
Valadão Freitas. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. V. Título.

NLM: WI 715

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me sustentou e me capacitou de uma forma única, como nunca havia sentido antes. Sem essa força, não tenho dúvidas de que não teria chegado até aqui.

Aos meus pais por todo suporte de sempre, por estarem sempre presentes em minhas vitórias e derrotas, por toda sabedoria e discernimento que me foram passados.

Ao Helbert, por todo amor, por ser meu ombro amigo, por entender minhas faltas e me ajudar em todo tempo.

À minha co orientadora e “mãe de laboratório” Daniela Valadão, por todas as correções, em todas as áreas da vida, correções estas que estão me tornando parte da profissional que sou hoje.

À minha segunda co orientadora, Priscila Ferri, que sempre acreditou em mim e me confiou este trabalho, por sua dedicação e presença.

À minha orientadora Prof. Debora Miranda, pelas correções, confiança e apoio para que este mestrado fosse possível.

Ao Prof. Maicon Albuquerque, por todas as palavras amigas e a disponibilidade para me ajudar nesta etapa final.

Aos meus amigos do laboratório de Medicina Molecular, em especial a Cinthia, que de longe ou de perto ajudou incansáveis vezes para a realização deste trabalho. À Thayana, pela amizade, foi o presente que o laboratório me deu. A Débora Moraes por toda ajuda e boa vontade.

Agradeço também aos que não citei aqui, mas de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa.

“There are only two ways to live your life. One is as though nothing is a miracle. The other is as though everything is a miracle.”
Albert Einstein

RESUMO

A Hepatite Autoimune é uma doença crônica hepática rara, caracterizada por perda da tolerância imunológica aos antígenos próprios hepáticos. Normalmente esta doença ocorre entre 10 e 30 anos de idade, sendo considerada rara em crianças. A associação da Hepatite Autoimune com a colangite autoimune é uma forma de complicação da doença. A susceptibilidade a HAI é parcialmente determinada pela presença de genes relacionados ao complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) e mais especificamente ao antígeno leucocitário humano (HLA), em particular variações alélicas do DRB1. Poucos estudos têm demonstrado o papel preditivo dos polimorfismos no gene HLA-DRB1 em crianças com HAI e suas implicações. O objetivo deste estudo foi descrever as frequências dos polimorfismos no gene HLA-DRB1 relacionados com a autoimunidade em crianças e adolescentes com HAI associada ou não com a CAI, comparando-as com o grupo controle saudável. Tratou-se de um estudo prospectivo transversal, incluindo 43 indivíduos, destes 25 com diagnóstico de HAI e 18 com diagnóstico da CAI. Os loci HLA-DRB1 foram identificados através da técnica de PCR-SSP. Os polimorfismos investigados foram HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07 e HLA-DRB1*13. A média de idade no momento da avaliação para os participantes do grupo controle foi 13.92 ± 4.55 anos e do grupo caso foi $15,86 \pm 6,34$. Nossos resultados demonstraram que indivíduos portadores dos polimorfismos HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*03 apresentaram um risco aumentado de desenvolver HAI. Pacientes que apresentavam a HAI e o polimorfismo HLA-DRB1*13 demonstraram um risco significativamente aumentado de desenvolver a CAI (OR = 3.96, p = 0.04). Os polimorfismos HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*07 não apresentaram associação com a HAI e CAI. Este estudo contribuiu para a investigação dos principais polimorfismos no gene HLA-DRB1 associados com a HAI e CAI na população pediátrica brasileira.

Palavras-chave: Hepatite autoimune, Colangite autoimune, HLA-DRB1, polimorfismo.

ABSTRACT

Autoimmune hepatitis (AIH) is a rare chronic inflammatory liver disease marked by a loss of immunological tolerance to self-antigens. Usually, this disease occurs between 10 and 30 years old, is considered rare in children. Comorbidity with autoimmune cholangitis may complicate this condition. Partially, susceptibility to AIH is determined by the presence of genes related to major histocompatibility complex II (MHC II) and most directly to human leukocyte antigen (HLA), in particular, allelic variants of DRB1. Few studies have demonstrated the predictive role of polymorphisms in HLA DRB1 in children with AIH and their implications for treatment. The purpose of this study was to describe frequencies of the polymorphisms in HLA gene with a relationship with autoimmunity in child and teenagers with autoimmune hepatitis with or without overlap syndrome, comparing both with a healthy control group. This is a prospective study of a cross-sectional cohort of including 43 individuals, 25 diagnosed with AIH type 1 and 18 with AIH type 1 overlap syndrome with autoimmune cholangitis. HLA-DRB1 locus was performed using PCR-SSP. The polymorphisms evaluated were *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07* and *HLA-DRB1*13*. The mean age at the time of evaluation among participants to the control group had a mean age of 13.92 ± 4.55 years and the case group $15,86 \pm 6,34$. Our results demonstrated that individuals with *HLA-DRB1*13* and *HLA-DRB1*03* polymorphisms have an increased risk of developing. Children who have the disease with *HLA-DRB1*13* presented a significantly increased to develop in the autoimmune cholangitis (OR = 3.96, p = 0.04). The *HLA-DRB1*04* and *HLA-DRB1*07* have not any association with the AIH and autoimmune cholangitis. This work contributed to the investigation of the main polymorphisms in the *HLA-DRB1* gene responsible associated with AIH with or without cholangitis in the Brazilian population.

Keywords: Autoimmune hepatitis, autoimmune cholangitis, HLA-DRB1, polymorphism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Caracterização da Hepatite Autoimune.....	17
Figura 2- Hepatite de Interface.....	18
Figura 3- Suposta fisiopatologia da HAI.....	21
Figura 4- O complexo HLA.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios de diagnóstico da HAI (Hennes et al. 2008).....	19
Tabela 2- Os polimorfismos HLA-DRB1 que conferem resistência ou susceptibilidade à HAI em diferentes populações.	26
Tabela 3- Critérios de classificação dos tipos de apresentação da HAI.....	33
Tabela 4- Iniciadores HLA-DRB1 alelo específicos.....	35
Tabela 5- Caracterização dos indivíduos portadores de HAI e indivíduos controle.	37
Tabela 6 - Comparação entre os principais fatores clínicos nos grupos HAI e HAI associada a CAI	38
Tabela 7- Regressão Logística para polimorfismos HLA-DRB1 nos grupos doente e controle.....	39
Tabela 8- Regressão Logística para os polimorfismos HLA- DRB1 nos grupos HAI e CAI.	40
Tabela 9- Regressão linear múltipla para os grupos de tipos de apresentação da doença nos polimorfismos HLA- DRB1.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT- Alanina aminotransferase
ANA – fator antinuclear
Anti- LC1 – anticorpo anticitosol hepático tipo 1
Anti- LKM1- anticorpo antimicrosomal fígado e rins tipo 1
APC- Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês *Antigen- presenting cell*)
ASGPR- receptor de asiaglicoproteína hepática
ASMA – Anticorpo antimúsculo liso
AST- Aspartato aminotransferase
CAI- Colangite autoimune
CAPES- Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CD- *Cluster* de diferenciação (do inglês *Cluster of differentiation*)
CEP – colangite esclerosante primária
CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPH- Complexo principal de histocompatibilidade
DNA- Ácido desóxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
EDTA- Ácido etilendiamina tetraacético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
EP- Erro padrão
etc- et cetera
EUA- Estados Unidos da América
Exp B- Expoente B
FAN- Fator antinuclear
FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
HAI- Hepatite autoimune
HLA – Antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigens*)
IC- Intervalo de confiança
IDT – Integrated DNA Technologies
IgA- Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IL- Interleucina
INF- γ - interferon- γ

LLEQKR- leucina, leucina, ácido glutâmico, lisina, e arginina
LLEQKR- Leu-Leu-Glu-Gln-Lis-Arg
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex*)
NK – *Natural Killer*
OR- Odds ratio
PCR- SSP- Single Specific Primer- Polymerase Chain Reaction
SNP- Single nucleotide polimorphism
taq- *Thermus aquaticus*
TCR- Receptor de células T (do inglês *T- cell receptor*)
TH- células T auxiliaadoras (do inglês *T helper cells*)
TNFRSF6- Membro 6 da superfamília do Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*)
TNF α – Fator de necrose tumoral – alfa (do inglês *Tumor necrosis fator- alfa*)
TREG- Linfócitos T reguladores (do inglês *Regulatory T lymphocyte*)
UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais
UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 - Histórico.....	15
1.2 - Epidemiologia e Caracterização	15
1.4 - Patogênese	19
1.5 - Sistema HLA.....	22
1.6 - Polimorfismos do <i>HLA</i> e Hepatite Autoimune.....	24
1.7 - Polimorfismos <i>HLA-DRB1</i> e alterações na molécula HLA.....	27
2. OBJETIVOS	30
2.1- Objetivo Geral.....	30
2.2- Objetivos secundários	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Delineamento e descrição da população estudada.....	31
3.2 Avaliação Clínica.....	32
3.3 Genes Estudados.....	33
3.4 Genotipagem.....	33
3.4.1- Coleta e processamento da Amostra biológica	34
3.4.2 – Reação em cadeia da polimerase com <i>primers</i> de sequências específicas (PCR-SSP).....	34
3.5 Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Caracterização da amostra	37
4.2 Análise dos polimorfismos.....	38
4.2.1. Polimorfismos HLA-DRB1 e risco de desenvolver HAI ou CAI	38
4.2.2. Polimorfismos <i>HLADRB1</i> e formas de manifestação da doença	40
5. DISCUSSÃO	42
6. ARTIGO ORIGINAL	48

7. CONCLUSÃO	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9. ANEXOS	72
9.1. Anexo 1- Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa- UFMG:	72
9.2 Anexo 2- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido:	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

A Hepatite autoimune (HAI) foi descrita pela primeira vez pelo médico Jan Gösta Waldenström, em 1950 como um grupo heterogêneo de doenças hepáticas caracterizado por elevação sérica policlonal das imunoglobulinas, presença de autoanticorpos na circulação e, geralmente, resposta benéfica a terapias imunossupressivas (Alvarez et al. 1999; Albert J. Czaja and Freese 2002; McFarlane 2002). Embora o nome “Hepatite autoimune” tenha sido proposto no início dos anos 1950, ele foi formalmente aceito apenas em 1993. Outros termos já foram utilizados anteriormente como: hepatite lupóide, hepatite ativa crônica, ou hepatite ativa crônica autoimune (Albert J. Czaja and Freese 2002; Liberal, Mieli-Vergani, and Vergani 2016).

1.2 - Epidemiologia e Caracterização

A prevalência da hepatite autoimune é variável nos diversos países, na Noruega a prevalência é de 1,9 casos por 100.000 habitantes (Boberg KM1, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M 1998), 1 caso por 200.000 habitantes na população geral dos Estado Unidos (Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014) e 20 casos por 100.000 mulheres acima dos 14 anos de idade na Espanha (Primo et al. 2004). Entre a população pediátrica, é uma doença rara que acomete, aproximadamente, 1 caso a cada 100.000 pacientes pediátricos (Corte et al. 2016). Esta doença pode ser diagnosticada em indivíduos de todas as idades e ambos os sexos. Estudos sugerem que a HAI tem uma distribuição de idades bimodal, com um primeiro pico entre 10 e 30 anos, e um segundo pico entre 40 e 50 anos (Heneghan et al. 2013; McFarlane 2002).

A HAI é uma doença inflamatória crônica que acomete os pacientes que perderam a tolerância imunológica aos antígenos próprios do fígado (Assis et al 2016). É caracterizada por hipergamaglobulinemia, pela presença de níveis

séricos elevados das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), níveis elevados de Imunoglobulina G (IgG) e pela presença de autoanticorpos. Caracteriza-se, também, pela presença de hepatite de interface e na exclusão de outras doenças hepáticas de causas conhecidas (Krawitt 2006; Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014).

O quadro clínico é amplo, variando de alterações laboratoriais assintomáticas a sintomas clínicos semelhantes a hepatite viral aguda. A apresentação clínica clássica é icterícia, colúria, febre, astenia, anorexia e aumento do volume abdominal na apresentação aguda ou insidiosa da doença (Albert J. Czaja and Freese 2002; Liu et al. 2013). Esplenomegalia, hepatomegalia, circulação colateral, ascite abdominal e sinais de doença crônica hepática podem estar presentes também. Aproximadamente 20% dos casos estão associadas com outras doenças crônicas autoimunes (G. V. Gregorio et al. 2001; Liu et al. 2013).

Existem duas formas de HAI, as quais podem ser distinguidas pela presença de autoanticorpos diferentes. A hepatite autoimune tipo 1 (HAI-1) é definida na presença de soropositividade para anticorpos antimúsculo liso (ASMA) e/ou fator antinuclear (ANA), enquanto a HAI tipo 2 (HAI-2) é definida pela positividade para anticorpos antimicrosomal fígado e rins tipo 1 (anti-LKM1) ou para anticorpo anticitosol hepático tipo 1 (anti-LC1) (Figura 1) (Krawitt 2006; Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014). Apesar de existirem estas duas formas, os critérios de diagnóstico e as opções de tratamento não diferem entre os dois grupos, mas pacientes com HAI-2 podem apresentar características clínicas distintas, pacientes mais jovens apresentam uma maior frequência de insuficiência hepática aguda, menores níveis de gamaglobulinas e aumento na incidência de deficiência de IgA (Paulo Lisboa Bittencourt et al. 2015; Thiele 2005).

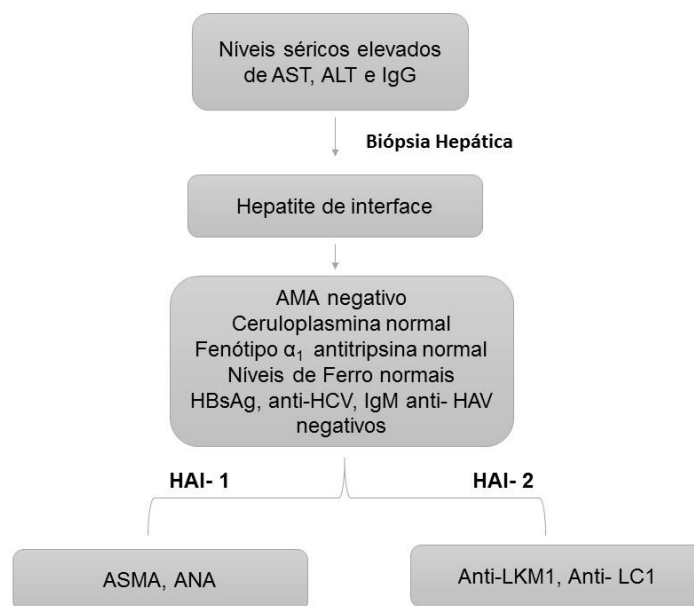


Figura 1- Caracterização da Hepatite Autoimune. (Paulo Lisboa Bittencourt et al. 2015) Adaptado.

Em adolescentes e adultos jovens tem sido descrita ainda uma sobreposição da HAI, que é a sua associação com uma colangite esclerosante, conhecida como colangite autoimune (CAI). Esta condição é caracterizada por achados de lesões de ductos hepáticos associadas às lesões do parênquima no mesmo paciente (Paulo Lisboa Bittencourt et al. 2015; Liu et al. 2013) .

1.3 – Diagnóstico

A HAI é considerada uma doença rara, desta forma, um ponto crucial para o diagnóstico é a exclusão de patologias mais comuns. O diagnóstico da HAI baseia-se, portanto, no conjunto dos fatores clínicos, bioquímicos, sorológicos e histológicos, e ainda na exclusão de outras causas de doenças hepáticas, como as hepatites virais, hemocromatoses, deficiência de antitripsina alfa-1, drogas indutoras de doença hepática, esteatose hepática não alcoólica e alcoólica (Paulo Lisboa Bittencourt et al. 2015; Albert J. Czaja and Freese 2002; Krawitt 2006; Liu et al. 2013).

Nas crianças, é mais difícil de diferenciar os níveis de comprometimento biliar, da HAI, da colangite esclerosante primária e CAI. O diagnóstico dos casos de hepatite fulminante não tem sido bem determinado porque o uso de

títulos 1/40 para os autoanticorpos são muito altos para crianças, títulos de 1/20 para ANA e SMA e 1/10 de anti-LKM1 já são considerados positivos neste grupo de idade. Por essas razões, a histologia é com frequência incluída nos critérios diagnósticos para a HAI em crianças (Liu et al. 2013). Desta forma, neste grupo de idade, a histologia é uma ferramenta importante para o diagnóstico, com alta especificidade (81-99%) e poder preditivo (62%- 91%), mas baixa sensibilidade (36%-57%). Alguns casos também demonstraram alterações nos ductos biliares, como infiltrado inflamatório nas células dos ductos, colestase e ductopenia, o que pode representar a CAI (Liu et al. 2013).

A biopsia hepática é importante para confirmação do diagnóstico e para avaliação da gravidade do dano hepático (Manns et al. 2010). A hepatite de interface é típica, se não exclusiva, da HAI, sendo caracterizada por infiltrado linfoplasmático, o qual cruza a placa limitante e invade o parênquima hepático. Outro achado atípico da HAI são hepatócitos edemaciados e/ou com necroses picnóticas e formação de rosetas. Plasmócitos são usualmente abundantes na interface e dentro do lóbulo, mas sua presença em baixa quantidade não exclui o diagnóstico de HAI (Figura 2) (Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014).

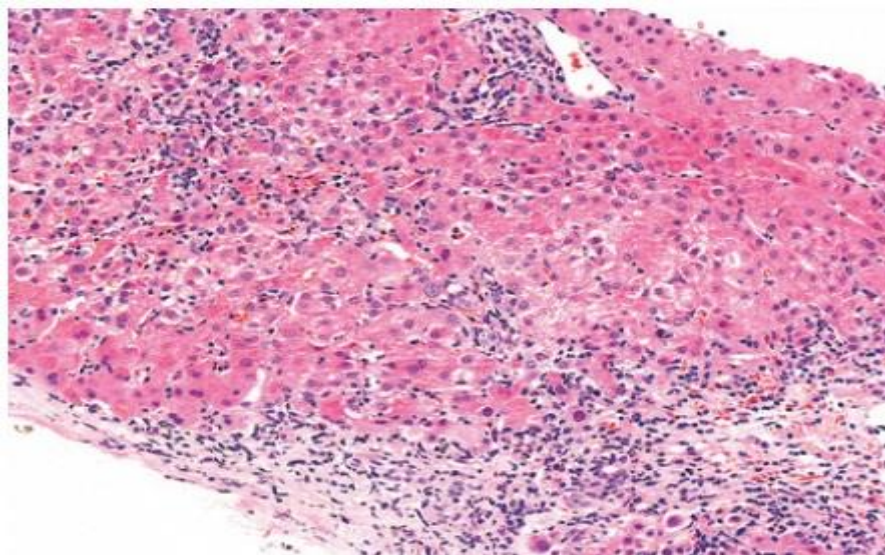


Figura 2- Hepatite de Interface- A hepatite de interface é um achado típico da HAI. Esta é caracterizada por número aumentado de linfócitos no espaço portal e periportal, e infiltrado de células plasmáticas as quais invadem o parênquima da placa limitante (Liberal, Mieli-Vergani, and Vergani 2013).

A determinação dos autoanticorpos circulantes específicos para tecido hepático também é chave para o diagnóstico e a caracterização das doenças hepáticas autoimunes. Na maioria das vezes, os autoanticorpos não são órgão-específico e sua expressão pode variar durante o curso da doença. Estes podem, também, estar presentes em outras infecções hepáticas, em doenças reumáticas, ou mesmo ausente em 10% dos casos (Tabela 1). Os títulos dos autoanticorpos não se correlacionam com a severidade da doença e seu curso clínico. Os títulos de SMA, são usados como marcadores de atividade da doença e podem ainda ser úteis para monitorar a resposta ao tratamento (Paulo Lisboa Bittencourt et al. 2015).

Critérios de Diagnóstico para a HAI
Níveis elevados de AST/ALT de 5-10 vezes superiores ao normal
Níveis de IgG > 1.10 vezes superiores ao normal
Soro positividade para ANA, ASMA ou Anti-LKM1 com titulações \geq 1:80
Sorologia negativa para hepatites virais
Histologia Hepática compatível com HAI

Tabela 1- Critérios de diagnóstico da HAI (Hennes et al. 2008)

A gravidade clínica e a resolução da HAI podem variar de acordo com a etnia da população. Os pacientes afroamericanos com HAI tendem a ter maiores índices de cirrose comparados com aqueles pacientes descendentes do norte da Europa. Pacientes de origem árabe, asiática ou africana apresentam a doença com características colestáticas. Estes mesmos pacientes têm uma resposta pior ao tratamento padrão com imunossupressores (K. N. Lim et al. 2001; Zolfino et al. 2002). Acredita-se que estas variações de origem étnica são provavelmente causadas por diferenças na genética, dieta e condições ambientais (Than, Jeffery, and Oo 2016).

1.4 - Patogênese

Estudos recentes demonstraram que dentro da hepatite de interface, receptores alfa e beta dos linfócitos T predominam sobre outros tipos celulares (Senaldi et al. 1992). Entre estes linfócitos, a maioria foi positiva para o as células CD4⁺ auxiliares, enquanto uma minoria foi positiva para as células citotóxicas CD8⁺. Outras células participam, tais como as células *Natural Killer* (NK), macrófagos e linfócitos B, e estas, estavam presentes em menor quantidade. Este estudo sugeriu um envolvimento de todas estas linhagens celulares na determinação do dano hepático (Senaldi et al. 1992), mas não pode inferir informações das células plasmáticas, dos subconjuntos de células T auxiliares (TH) e das células T reguladoras (TREG), uma vez que ainda não tinham sido definidos marcadores histoquímicos adequados para estas células (Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014).

As doenças hepáticas autoimunes, normalmente, são caracterizadas por um infiltrado hepático de células TCD4⁺ e TCD8⁺, as quais apresentam citotoxicidade sobre as células hepáticas e biliares e liberam citocinas inflamatórias, como interferon- γ (INF- γ) e interleucina-17 (IL-17) (Derek G. Doherty 2016). Normalmente, estas células T efetoras são reguladas por populações de células TCD4⁺, denominadas células T reguladoras (TREG), que medeiam a supressão de antígenos-específicos e a prevenção de autorreatividade (Josefowicz, Lu, and Rudensky 2012; Mills 2004). Um desequilíbrio entre as células efetoras e reguladoras parece destacar a perda da tolerância imunológica aos antígenos próprios na maioria das doenças autoimunes (Figura 3) (Derek G. Doherty 2016).

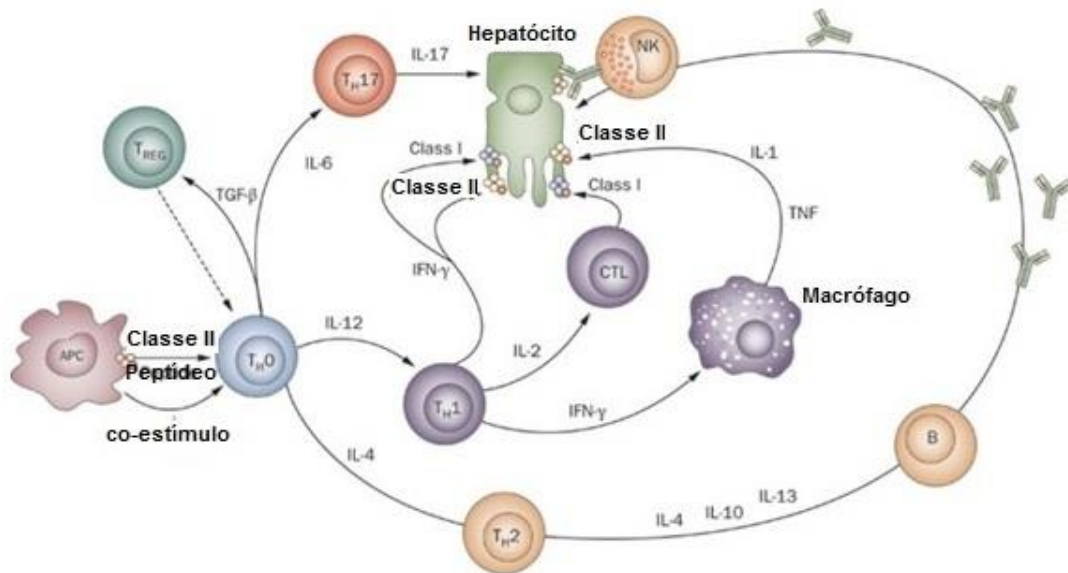


Figura 3- Suposta fisiopatologia da HAI (Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014) Adaptada.

Uma das teorias fisiopatológicas envolve a apresentação de um peptídeo antigênico do sítio de ligação ao antígeno do MHC classe II. Fatores genéticos, principalmente os polimorfismos no gene *HLA DRB1* 0301* e *0401*, que serão explicados mais adiante, codificariam a estrutura do sítio de ligação ao antígeno, afetando assim a natureza do antígeno. As células TCD4 irão reconhecer este antígeno apresentado pela célula apresentadora de antígeno (APC), completando o primeiro sinal coestimulatório necessário para a ativação imunológica. A ligação da APC com a célula TCD4, através das moléculas B7 e CD28, completa o segundo sinal coestimulatório necessário para a ativação imunológica. Com a ativação das células TCD4, podem ser produzidas citocinas que ou facilitam a expansão clonal de células T citotóxicas (resposta de citocinas tipo 1), ou ativam as células plasmáticas produzindo anticorpos (respostas de citocina tipo 2) (Albert J. Czaja and Freese 2002).

As deficiências no número e na função das células TREG e NK e os polimorfismos genéticos no *TNFA*2* e *TNFRSF6* aumentam a resposta de

citocinas tipo 2 e a proliferação do infiltrado hepático citotóxico das células T. As células T citotóxicas se ligam aos hepatócitos através do ligante Fas promovendo a apoptose destes hepatócitos. As imunoglobulinas, produzidas pela expansão clonal das células plasmáticas, ligam-se aos constituintes normais da membrana dos hepatócitos e atraem as células NK com receptores Fc, e os hepatócitos sofrem citólise (Albert J. Czaja and Freese 2002).

A patogênese da HAI, contudo, é um processo complexo e a etiologia exata ainda é desconhecida, pois se apresenta como uma condição em que o modo de herança envolve um ou mais genes que operam sozinhos ou em conjunto, em combinação com fatores ambientais (De Boer et al. 2014; Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014). Possivelmente, uma infecção viral ou toxina ambiental por exemplo, poderia alterar epitopos nos hepatócitos, o que desencadearia uma resposta imune, através de mimetismo molecular (Than, Jeffery, and Oo 2016; Zachou et al. 2013). Sabe-se que a susceptibilidade é parcialmente determinada pela presença de genes relacionados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) ou MHC (da sigla em inglês, *major histocompatibility complex*) (Liu et al. 2013).

1.5 - Sistema HLA

O MHC, em humanos denominado HLA (*human leukocyte antigens*), representa um conjunto de *locus* gênicos responsável pela síntese de proteínas cuja principal função é a apresentação de peptídeos aos linfócitos T no sistema imunológico (Stephens et al. 1999). A sequência genômica do HLA, contém aproximadamente 260 genes sobre um intervalo de aproximadamente 4Mb na região cromossomal 6p21.3. Os genes altamente polimórficos que codificam os aloantígenos clássicos HLA classe I e II apresentam um papel importante na determinação da especificidade da resposta adaptativa imune, susceptibilidade a doenças autoimunes e infecciosas, e no resultado de transplantes (Umemura and Ota 2015).

Existem três genes HLA de classe I denominados *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, que codificam três tipos de proteínas HLA de classe I com os mesmos nomes. Existem três loci do gene HLA de classe II denominados HLA-DP, HLA-

DQ e HLA-DR. Cada molécula HLA de classe II é composta por um heterodímero de polipéptidos α e β , e os loci DP, DQ e DR contêm, cada um deles, genes separados designados A ou B, que codificam cadeias α e β , respectivamente, em cada cópia do cromossomo 6 (Abbas, Lichtman, and Pillai 2015) (Figura 4).

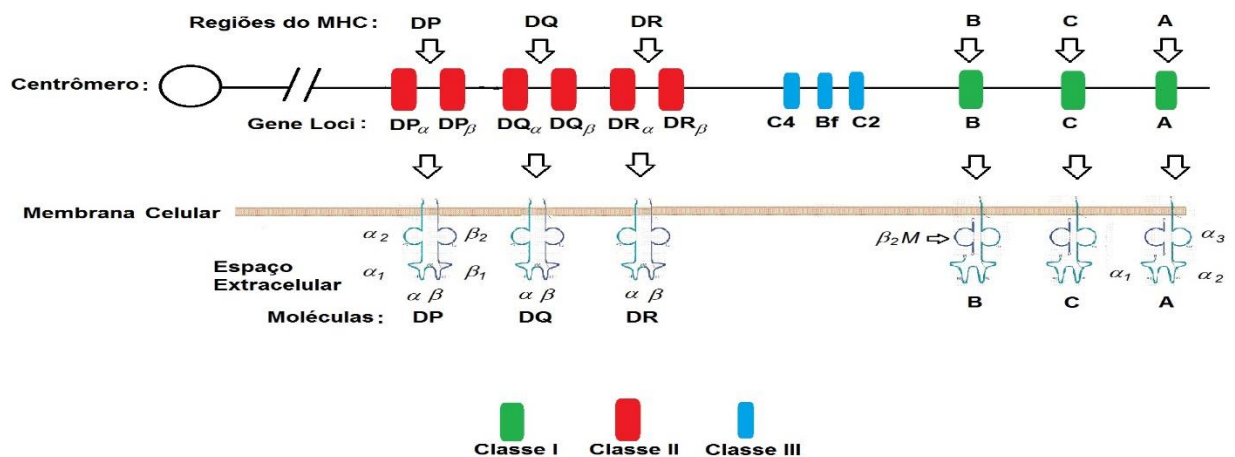


Figura 4- O complexo HLA. Cada indivíduo tem dois genes HLA-DP (DPA1 e DPB1, que codificam cadeias α e β), dois genes HLA-DQ α (DQA1, 2), um gene HLA-DQ β (DQB1), um gene HLA-DR α (DRA1) e um ou dois gene HLA-DR β (DRB1 e DRB3, 4 ou 5) (Abbas, Lichtman, and Pillai 2015; Umemura and Ota 2015)- Adaptado.

A nomenclatura do locus *HLA* leva em consideração a grande quantidade de polimorfismos identificados por métodos sorológicos e moleculares. Assim, com base na tipagem molecular, os alelos individuais podem ser denominados *HLA-A * 0201*, referindo-se ao subtipo 01 de *HLA-A2*, ou *HLA-DRB1 * 0401*, referindo-se ao subtipo 01 do gene *DR4B1* e assim por diante (Abbas, Lichtman, and Pillai 2015).

Uma predisposição genética à HAI já foi atribuída a vários genes, especialmente aqueles que codificam os *HLAs*. A sorologia do HLA tem sido extensivamente estudada nos pacientes com HAI. Após o advento da tipagem do *HLA* por métodos de PCR, foram publicados vários estudos sobre os alelos *HLA* (Umemura and Ota 2015).

1.6 - Polimorfismos do *HLA* e Hepatite Autoimune

Nas populações mexicanas (Vázquez-García et al. 1998), coreanas (Y. S. Lim et al. 2008) e japonesas (Umemura et al. 2014), a HAI foi associada com os alelos *DRB1*04:04* e *DRB1*04:05*. Em europeus e norte americanos os principais polimorfismos associados são *HLA-DR3* e *HLA-DR4* (*DRB1*03* e *DRB1*04*) (Albert J. Czaja and Freese 2002; Albert J. Czaja and Manns 2010; Peter T. Donaldson et al. 1991), estudos sugerem ainda o envolvimento do alelo *HLA-DRB1*1501* em menor frequência nos grupos de pacientes se comparados aos indivíduos livres da doença (P T Donaldson 2004; Heneghan et al. 2013). Já na população brasileira, foi observado um aumento na frequência do *HLA- DRB1*13:01* entres os indivíduos portadores de HAI se comparado aos indivíduos americanos portadores da doença (Albert J. Czaja et al. 2002).

Vários estudos demonstram ainda risco ou proteção contra a HAI em diferentes populações (Tabela 2). Estudos com a população de pacientes do norte da Europa de ancestralidade britânica identificaram maior susceptibilidade aos alelos *HLA-DRB1*0301* e *DRB1*0401* com o aumento do risco e os alelos *HLA-DRB1*07*, *01*, *02* com a proteção contra a doença (D.G. Doherty et al. 1994; Peter T. Donaldson et al. 1991; Strettell et al. 1997). Outros estudos demonstram que entre os norte-americanos caucasianos *HLA DRB1*03* e *HLA DRB1*04* são fatores de risco independentes para a doença (Albert J. Czaja, Carpenter, and Moore 2008; D.G. Doherty et al. 1994; Peter T. Donaldson et al. 1991). Já os polimorfismos *HLA DRB1*13* e *HLA DRB1*03* têm sido observados tanto nas populações norte americanas quanto na América do Sul. Em estudos no Brasil e Argentina foi observado um risco aumentado do desenvolvimento da doença em pacientes com estes polimorfismos, sendo o *HLA-DRB1*03:01* juntamente com o *HLA-DRB1*07* associado com risco da HAI tipo 2 (P L Bittencourt et al. 1999; Goldberg et al. 2001; Pando et al. 1999).

População	Polimorfismos	Risco Relativo	n	Idade média	Conclusão	Referências
Europa	<i>HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04</i>	-	-	-	Risco de desenvolver HAI	(Alvarez et al. 1999)
Europa	<i>HLA-DRB1*04:01</i>	3.9	376	± 40	Risco de desenvolver HAI, sem a presença do polimorfismo HLA-DRB3*0101.	(D G Doherty et al. 1994)
Europa	<i>HLA-DRB1*03:01 HLA-DRB1*04:01;</i>	4.58 4.97	188	± 40	Risco de desenvolver HAI	(Strettell et al. 1997)
Europa	<i>HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*02</i>	-	-	-	Proteção contra a HAI	(Alvarez et al. 1999)
Estados Unidos	<i>HLA-DRB1*1301</i>	-	708	± 48	Frequência aumentada nos pacientes com HAI. sem os polimorfismos HLA-DRB1*04 e -DRB1*03, frequência maior	(Albert J. Czaja, Carpenter, and Moore 2008)

Argentina	<i>HLA-DRB1*03:01;</i> <i>HLA-DRB1*13:01</i>	3.0 16.3	41 4	± 9 ± 40	Risco de desenvolver a HAI	(Pando et al. 1999)
	HLA-DRB1*13	6.9	26 8	± 12	Risco aumentado do desenvolvimento da HAI	(P L Bittencourt et al. 1999)
Brasil	<i>HLA-DRB1*03:01;</i> <i>HLA-DRB1*07</i>	-	61	-	Frequência aumentada em pacientes com HAI	(Goldberg et al. 2001)
Argentina Brasil	<i>HLA-DRB1*13:02</i>	0.1	41 4	± 9 ± 40	Proteção contra HAI	(Pando et al. 1999)

Tabela 2- Os polimorfismos HLA-DRB1 que conferem resistência ou susceptibilidade à HAI em diferentes populações.

Além dos alelos HLA mediar a susceptibilidade ou resistência à HAI, estes podem ainda atuar modificando os aspectos clínicos da doença (P T Donaldson 2004). Pacientes com HAI, que apresentam o polimorfismo *HLA-DRB1*03:01*, apresentam idade menos avançada que os pacientes com

*DRB1*04:01* (Peter T. Donaldson et al. 1991; Montano-Loza, Carpenter, and Czaja 2006). Estes pacientes evoluem para óbito com uma frequência maior, por dano hepático, ou requerem transplante hepático e têm uma frequência significativamente maior de resposta adversa ao tratamento do que os pacientes com *DRB1*04:01* (A J Czaja et al. 1997). Pacientes com *DRB1*04* são mais comumente mulheres, e estes frequentemente apresentam múltiplas doenças imunes concomitantes (A J Czaja et al. 1997; Albert J. Czaja and Manns 2010). O polimorfismo *HLA-DRB1*07* tem sido associado com a produção de anti-LKM1 (P L Bittencourt et al. 1999), e *HLA-DRB1*13:01* tem sido associado com maior gravidade da doença principalmente em crianças sul-americanas (Albert J. Czaja et al. 2002; Albert J. Czaja and Manns 2010; Goldberg et al. 2001).

1.7 - Polimorfismos *HLA-DRB1* e alterações na molécula HLA

Depois que os alelos polimórficos *HLA-DRB1* são traduzidos para uma sequência de aminoácidos, estas associações de susceptibilidade e resistência são reanalisadas, com a finalidade de avaliar as substituições e modificações específicas de cada polimorfismo, vários estudos de comparação têm sido desenvolvidos. Serão apresentados a seguir, os três modelos moleculares propostos que conferem susceptibilidade e resistência à HAI (D.G. Doherty et al. 1994; Ota et al. 1992; Pando et al. 1999; Strettell et al. 1997).

Todos estes modelos partem do princípio de que a susceptibilidade à doença é modulada pelas diferenças nas sequências dos aminoácidos no sítio funcional da molécula MHC codificada. Mudanças no aminoácido, na região da α -hélice e no final deste sítio alteram a afinidade e avidéz com a qual o peptídeo é ligado e determina a orientação final do peptídeo dentro do sítio de ligação para o reconhecimento dos receptores das células T (TCR). As mudanças nos aminoácidos influenciam tanto o reconhecimento do peptídeo e MHC, quanto a interação do complexo peptídeo-MHC com o TCR (Brown et al. 1993, 2015).

O primeiro modelo molecular para HAI-1, baseado em experimentos japoneses (Ota et al. 1992), identifica histidina, que é encontrada em todos os

alelos *DR4*, ou arginina, encontrada em todos os alelos *DR2*, na posição 13 do polipeptídeo DR- β como um fator crítico determinante da susceptibilidade à doença (Peter T Donaldson 2002).

O segundo modelo é fundamentado na propriedade do epitopo do sexto aminoácido – leucina, leucina, ácido glutâmico, lisina, e arginina, ou LLEQKR- nas posições 67 a 72, respectivamente do polipeptídeo DR β (D.G. Doherty et al. 1994; Strettell et al. 1997). Esta sequência é compartilhada por ambos alelos *HLA-DRB1*03:01* e *HLA-DRB1*04:01*, os principais que conferem susceptibilidade aos europeus e norte americanos. Um detalhe adicional deste modelo é a indicação de que a lisina-71 é um aminoácido crítico. Assim, alelos protetivos codificam alanina na posição 71, que é um aminoácido neutro apolar, e alelos susceptíveis codificam a lisina, que é um aminoácido polar altamente carregado (Peter T Donaldson 2002).

O terceiro e mais recente modelo foi criado de acordo com o dimorfismo valina/glicina na posição 86 do polipeptídeo DR β . Este modelo foi proposto para explicar a observação de que crianças com HAI-1 na Argentina tem um aumento significativo nas frequências dos polimorfismos *HLA-DRB1*03:01* e *HLA-DRB1*13:01* (Pando et al. 1999). O polimorfismo *DRB1*13:01* não se encaixa em nenhum dos modelos alternativos anteriores. Entretanto, estes dois alelos codificam cada um a valina no DR β 86, que é um aminoácido não polar sem cadeias laterais carregadas, enquanto a glicina é um aminoácido polar (Peter T Donaldson 2002).

Assim, estas associações HLA podem atuar como marcadores moleculares dos principais desencadeantes ambientais que aceleram a doença. Diante do exposto, supõe-se que esses marcadores podem variar de população para população (P T Donaldson 2004).

Poucos estudos têm demonstrado o papel dos imunofenótipos da HAI e aplicação destes marcadores como indicadores de resposta ao tratamento e prognóstico da doença na população brasileira, onde há uma miscigenação de grupos étnicos que pode dificultar a padronização de fenótipos de acordo com cada polimorfismo apresentado (Liu et al. 2013). Tem-se um interesse de estudar tais polimorfismos nesta população, principalmente nos pacientes jovens, os quais apresentam a doença muitas vezes mais grave e seguida de associação com CAI e pouca resposta aos tratamentos terapêuticos

disponíveis (Liu et al. 2013; Manns et al. 2010; Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014).

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Investigar os polimorfismos do gene *HLA* relacionados a autoimunidade em crianças e adolescentes, com diagnóstico de hepatite autoimune, associada ou não à colangite autoimune, comparando com o grupo controle.

2.2- Objetivos secundários

- Avaliar os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* e correlaciona-los com hepatite autoimune e colangite autoimune;
- Identificar os polimorfismos do gene *HLA-DRB1* que apresentam risco de desenvolver a doença ou proteção contra a doença;
- Demonstrar as alterações clínicas que se relacionam com os polimorfismos estudados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento e descrição da população estudada

Trata-se de um estudo prospectivo transversal apresentando 25 pacientes com diagnóstico de HAI, 18 pacientes com hepatite autoimune associada à colangite autoimune, totalizando 43 indivíduos atendidos de janeiro de 1986 a janeiro de 2017 no Hospital São Vicente da UFMG. O grupo controle, recrutados da Faculdade de Medicina da UFMG, foi composto de crianças adolescentes e jovens adultos com idades pareadas com o grupo de pacientes, saudáveis, sem histórico familiar e pessoal de doenças autoimunes.

A seleção de pacientes com HAI foi realizada a partir de uma casuística de 134 indivíduos, sendo que dentre esses, 28 tinham diagnóstico de CAI. Foram utilizados como critérios de inclusão no estudo o acompanhamento regular no serviço, 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 (Alvarez et al. 1999; Dalekos et al. 2008). 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 CAI. 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. Estes pacientes foram todos diagnosticados quanto a HAI ou a HAI associada a CAI durante a infância, ou quando houve a evolução para a CAI.

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

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 2). Foi lido e assinado por pesquisadores, pacientes e grupo controle o termo de consentimento livre e esclarecido. Os projetos de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Anexo 1).

3.2 Avaliação Clínica

São realizadas avaliações clínicas periódicas em intervalos de 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:

A) 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 ilícitas.

Os pacientes foram classificados em quatro formas de apresentação clínica, como descritos na tabela abaixo (Tabela 3). 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.

Apresentação da doença	Sintomas e manifestações
Assintomática	Diagnóstico por achado laboratorial isolado ou hepatomegalia detectada ao exame clínico
Hepatite aguda	Manifestações semelhantes a Hepatite viral aguda
Hepatite crônica	Presença de adinamia, anorexia, ascite, hepatomegalia, icterícia intermitente, esplenomegalia
Falência hepática grave	Semelhante a insuficiência hepática fulminante, com desenvolvimento de encefalopatia no prazo de 8 semanas do início dos sintomas

Tabela 3- Critérios de classificação dos tipos de apresentação da HAI.

B) Exame físico: Os pacientes foram 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.

3.3 Genes Estudados

Com o propósito de possibilitar a caracterização do sistema HLA e avaliar as influências dos polimorfismos na HAI, foram escolhidos para estudo os polimorfismos nos loci *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*13*. Estes polimorfismos, foram selecionados de acordo com o que a literatura demonstrou ser os principais influenciadores da HAI para uma população com as características semelhantes à amostra deste trabalho (P L Bittencourt et al. 1999; Goldberg et al. 2001; Liu et al. 2013; Pando et al. 1999).

3.4 Genotipagem

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).

3.4.1- Coleta e processamento da Amostra biológica

Foi realizada coleta de aproximadamente 4mL sangue venoso total em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Após no mínimo 24 horas e no máximo 7 dias da coleta o DNA genômico foi extraído pelo método salino (Lahiri and Schnabel 1993).

Uma vez isolado, o DNA foi quantificado através de espectrofotometria (NanoDrop™ 2000- Thermo Scientific, EUA). A razão 260/280 foi determinada para estimar o grau de pureza do DNA em relação a quantidade de proteínas, sendo utilizado o valor entre 1,8 e 2 como ideal. E a razão 260/230 foi também determinada para avaliar o grau de pureza do DNA em relação a impurezas presentes na amostra, sendo utilizado o valor entre 2,0 e 2,2 como ideal. Em seguida, o DNA foi diluído para a concentração de 50ng/uL para as genotipagens posteriores.

3.4.2 – Reação em cadeia da polimerase com *primers* de sequências específicas (PCR-SSP)

Para a determinação dos polimorfismos nos loci *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*13* a técnica utilizada foi a PCR-SSP, e os iniciadores específicos para cada polimorfismo foram desenhados baseados em estudos anteriores (Diao et al. 2014; Zetterquist and Olerup 1992). Foi ainda adicionado à reação de PCR o gene da β - actina (ACTB), de 110 pb cujos *primers* são F 5'- GGACCTGACTGACTACCTCAT-3' e R 5'- CGT AGCACAGCTTCTCCTTAAT- 3', como gene constitutivo. Os iniciadores específicos HLA-DRB1, seus respectivos locus, tamanhos e temperaturas de anelamento estão descritos na tabela a seguir:

<i>HLA-DRB1</i> específicos	Iniciador 5'	Iniciador 3'	Temp. de anel.	produto (pb)
--	---------------------	---------------------	---------------------------	-------------------------

			(°C)	
0301-0302	TACTTCCATAACCAGG AGGAGA	TGCAGTAGTTGTCCA CCCG	61	151
0401-0402	GTTTCTTGGAGCAGGT TAAACA	CTGCAGTAGGTGTCC ACCG	58	223
0701-0701	CCTGTGGCAGGGTAAG TATA	CCCGTAGTTGTGTCT GCACAC	58	232
1301-1302	TACTTCCATAACCAGG AGGAGA	CCCGCTCGTCTTCCA GGAT	57	130

Tabela 4- Iniciadores HLA-DRB1 alelo específicos.

Os primers foram sintetizados pela Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Integrated DNA Technologies (IDT) e Alpha DNA.

Cada tubo de reação de PCR continha 50ng do DNA genômico a ser testado, 0,5U de taq polimerase, 0,5mmol de dNTP's, 1,5mmol de MgCl₂, 0,2mmol de primer 5' e 3' de cada alelo HLA-DRB1. As condições para PCR foram: desnaturação a 95°C por 10 min; temperatura de anelamento foi específica de cada primer por 30s, como detalhado na tabela 4; extensão a 72° por 1 min e 35 ciclos. De acordo com o protocolo do fabricante (Hot Start Polymerase- M5005 Promega).

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio 0,1%, as condições da corrida foram 100Volts, aproximadamente 140 miliampères por 60 minutos. Após a eletroforese, as bandas foram detectadas a partir da incidência de luz UV sobre os géis com o aparelho ImageQuant (National Institutes of Healthy, EUA) onde foi possível visualizar a presença ou ausência do polimorfismo. Para confirmação, as amostras positivas foram novamente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de 6,5% e corado em nitrato de prata. Foram consideradas positivas, aquelas amostras onde foi possível observar a presença de bandas de tamanho específico para cada polimorfismo por três pesquisadores independentes.

Foram excluídas do estudo amostras que apresentavam quantidade insuficiente de DNA, onde não foi possível o contato com o paciente, e

amostras que não apresentaram positividade para o gene constitutivo ACTB, totalizando 7 pacientes excluídos.

3.5 Análise Estatística

Para os dados descritivos foram avaliadas as características dos grupos casos e controles. Estes dados foram comparados pelo teste de Mann Whitney no caso de variável quantitativa ser a idade, visto que esta variável apresentou uma distribuição não-normal ($p < 0,05$). A variável qualitativa, gênero, foi comparada utilizando o teste de qui-quadrado.

Para avaliação das frequências dos polimorfismos, a estimativa de risco determinada pela presença dos polimorfismos (*odds ratio*, OR) e ainda sua capacidade de prever a ocorrência ou não de cirrose, foram realizadas pela análise de regressão logística.

Todas as análises foram executadas no programa SPSS, versão 24 (SPSS 24 for Windows). Para todas as comparações, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 100 indivíduos, sendo 25 pacientes com diagnóstico de HAI, 18 com diagnóstico de CAI, totalizando 43 pacientes no grupo de casos e 57 controles saudáveis. Destes, 34 indivíduos eram do sexo masculino (34%) e 66 indivíduos do sexo feminino (66%). A frequência dos indivíduos do grupo controle para o sexo masculino foi de 35,1% e para o sexo feminino foi de 64,9%. Entre os indivíduos do grupo caso para o sexo masculino a frequência foi 32,6% e para o sexo feminino foi 67,4% (Tabela 5). Não houve diferenças significativas entre os grupos casos e controles para o sexo, $X^2_{(1)} = 0,70$, ($p > 0,05$).

Tabela 5- Caracterização dos indivíduos portadores de HAI e indivíduos controle.

	Controle	Casos	Total
Sexo Masculino	35,1%	32,6%	34%
Sexo Feminino	64,9%	67,4%	66%

A média total de idade, no momento da avaliação, entre os participantes foi de $14,81 \pm 5,53$ anos, o grupo controle apresentou média de idade de $13,92 \pm 4,56$ anos e o grupo caso $15,86 \pm 6,34$ anos, no momento da avaliação. Esta pareceu não diferir entre o grupo controle e o grupo caso ($U = 887$, $p = 0,11$, $r = -0,16$).

A média de idade do início dos sintomas clínicos e a média de idade no momento em que foram feitas as avaliações não diferiram entre os grupos HAI e HAI associada a CAI ($p = 0,61$ e $p = 0,91$ respectivamente). A frequência do gênero foi de 76% para o sexo feminino e 24% para o sexo masculino no grupo HAI. Para o grupo HAI associada à CAI a frequência de pacientes do sexo feminino foi 55,5% e do sexo masculino de 44,5%. Estas frequências não

apresentaram diferenças significativas entre os grupos de pacientes ($X^2_{(1)} = 1,99$, $p = 1,99$).

As frequências das formas de apresentação da doença serão apresentadas a seguir, estas, não mostraram diferenças de significância entre grupos de pacientes ($X^2_{(3)} = 3,32$, $p = 0,34$). No grupo HAI a doença se apresentou principalmente de forma aguda ou crônica. Enquanto o grupo CAI teve uma frequência maior de indivíduos com a doença assintomática ou crônica. Este grupo apresentou ainda uma frequência maior de pacientes portadores de insuficiência hepática do que o grupo com HAI, demonstrando que a doença tem uma forma mais grave no grupo CAI, como já havia sido descrito por outros autores. Entretanto todos estes achados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre os principais fatores clínicos nos grupos HAI e HAI associada a CAI

	Hepatite autoimune (n = 25 pacientes)	Hepatite autoimune associada a colangite autoimune (n = 18 pacientes)	Significância estatística (Valor p)
Média de Idade de início dos sintomas clínicos	9,12 (± 3,11)	8,52 (± 3,30)	0,61
Média de Idade no momento da avaliação	16,04 (± 6,12)	15,61 (± 6,63)	0,91
Gênero (feminino n)	19 (76%)	10 (55,5 %)	0,15
Formas de Apresentação (número de pacientes)			
Insuficiência Hepática	2 (8%)	3 (16,7%)	0,38
Hepatite aguda	8 (32%)	2 (11,1%)	0,10
Hepatite crônica	12 (48%)	9 (50%)	0,89
Assintomática	3 (12%)	4 (22,2%)	0,37

4.2 Análise dos polimorfismos

4.2.1. Polimorfismos HLA-DRB1 e risco de desenvolver HAI ou CAI

Foi realizada uma comparação entre cada um dos polimorfismos e os grupos de casos e controles, a fim de se avaliar quais seriam as chances de

um indivíduo portador do polimorfismo desenvolver a HAI. A partir desta estatística foi possível observar que os indivíduos portadores dos polimorfismos *HLA-DRB1*13* têm um risco 7 vezes maior de desenvolver a HAI (OR= 7,2; $p < 0,001$) e os portadores do polimorfismo *HLA-DRB1*03* têm um risco 3,5 vezes maior de desenvolver a HAI (OR= 3,57; $p < 0,01$) do que os indivíduos livres de doença. Para os pacientes do grupo caso portadores do gene *HLA-DRB1*07* foi encontrada uma associação inversamente proporcional, o que significaria que este polimorfismo se apresentaria como um fator protetor contra a HAI, entretanto, este risco não foi estatisticamente significativo (OR= 0,21; $p = 0,057$; Tabela 7).

O polimorfismo *HLA-DRB1*0401* teve associação de proteção com os indivíduos da amostra estudada sem significância estatística (OR= 0,37; $p = 0,64$; Tabela 7).

Tabela 7- Regressão Logística para polimorfismos HLA-DRB1 nos grupos doente e controle.

SNP	B (EP)	OR (95% IC)	P
DRB1*03	1,27 (0,51)	3,57 (1,31 - 9,73)	0,013
DRB1*07	-1,56 (0,82)	0,21 (0,04 - 1,04)	0,057
DRB1*13	2,02 (0,50)	7,52 (2,83 - 19,94)	< 0,05

Nota: $R^2=0,95$ (Hosmer e Lemeshow), 0,28 (Cox e Snell), 0,37 (Nagelkerke), $X^2(3)$ do Modelo= 32,327, DRB1*04- variável removida no passo 3 de 5. Legenda: B- valor beta; EP- Erro Padrão; OR- Odds ratio; IC- Intervalo de Confiança.

Comparamos ainda os polimorfismos entre os grupos de pacientes que apresentavam a HAI e a HAI associada a CAI, a fim de avaliar se os polimorfismos eram capazes de influenciar na evolução da doença. Nesta análise, apenas o *HLA-DRB1*13* apresentou uma chance significativamente aumentada em quase 4 vezes do indivíduo portador deste evoluir para a CAI (OR= 3,96; $p = 0,04$; Tabela 8).

Tabela 8- Regressão Logística para os polimorfismos HLA- DRB1 nos grupos HAI e CAI.

SNP	B (EP)	OR (95% IC)	P
DRB1*13	1,38 (0,67)	3,96 (1,07 - 14,61)	0,04

Nota: $R^2=0,09$ (Cox e Snell), 0,13 (Nagelkerke), $X^2(1)$ do Modelo= 4,481, DRB1*03- variável removida no passo 5 de 7, DRB1*04- variável removida no passo 4 de 7, DRB1*07- variável removida no passo 2 de 7. Legenda: B- valor beta; EP- Erro Padrão; OR- Odds ratio; IC- Intervalo de Confiança.

4.2.2. Polimorfismos *HLADRB1* e formas de manifestação da doença

A fim de avaliar as formas de manifestação da HAI que os polimorfismos estudados seriam capazes de prever, os indivíduos do grupo caso foram subdivididos em grupos de acordo com a forma como a HAI se apresentava clinicamente (n= 43). Estes polimorfismos juntos são responsáveis por apenas 19% dos tipos de apresentação da doença ($R^2= 0,194$), a diferença entre o R^2 e o R^2 ajustado foi de 0,085 (0,194- 0,109), o que significa que se o modelo fosse derivado da população em vez de uma amostra, ele explicaria 8,5% da variância dos tipos de apresentação da doença.

Podemos observar ainda que quando os polimorfismos *HLA-DRB1*13*, *HLA-DRB1*03* e *HLA-DRB1*07* estão presentes o comprometimento clínico da doença é menor ($\beta = - 0,36$; $-0,44$ e $- 0,91$ respectivamente), caracterizada por uma HAI assintomática ou uma hepatite crônica, sendo o *HLA-DRB1*07* o que tem uma relação mais forte com a apresentação a doença ($\beta = - 0,91$). Indivíduos positivos para o polimorfismo *HLA-DRB1*04* têm maior risco de desenvolver uma hepatite aguda ou uma insuficiência hepática devido a HAI. Contudo, nenhuma destas associações foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9- Regressão linear múltipla para os grupos de tipos de apresentação da doença nos polimorfismos HLA- DRB1.

SNP	B (EP)	β	P
<i>DRB1*13</i>	-0,36 (0,28)	-0,20	0,20
<i>DRB1*03</i>	-0,44 (0,26)	-0,25	0,10
<i>DRB1*07</i>	- 0,91 (0,51)	-0,26	0,08
<i>DRB1*04</i>	0,23 (0,39)	0,09	0,55

Nota: $R^2= 0,03$ para o passo 1; $\Delta R^2= 0,068$ para o passo 2; $\Delta R^2= 0,12$ para o passo 3; $\Delta R^2= 0,11$ para o passo 4. Legenda: EP- Erro Padrão;

Foi ainda avaliada a capacidade que estes polimorfismos teriam de prever a presença ou ausência de cirrose nos pacientes do grupo caso. Nenhum dos genes *HLA-DRB1* foram capazes de prever o desenvolvimento de cirrose nos indivíduos acometidos pela HAI ou HAI associada a CAI ($p > 0,05$, dados não mostrados).

5. DISCUSSÃO

A idade e o gênero do grupo caso e controle foram semelhantes, isso demonstra a homogeneidade dos dados estudados. Estes resultados foram semelhantes ao de outras casuísticas, no qual há uma frequência maior de adolescentes do sexo feminino (Germana V. Gregorio et al. 1997; Rojas et al. 2014). Entre os grupos de pacientes, as idades foram semelhantes e o início do aparecimento dos sintomas foi entre 8 e 9 anos de idade (ver tabela 7). Os grupos de pacientes HAI e CAI não apresentaram diferenças significativas entre as quatro formas de apresentação da doença, provavelmente por se tratar de uma casuística pequena. Outros estudos descrevem que a doença pode ser de maior gravidade quando há presença de CAI (G. V. Gregorio et al. 2001; Rojas et al. 2014) .

Nossos resultados demonstram que a susceptibilidade a HAI pode estar ligada aos polimorfismos *HLA-DBR1*13* e *HLA-DBR1*03* na população brasileira. Ambos os alelos *HLA-DBR1*13* e *HLA-DBR1*03* estavam presentes na maioria dos pacientes do grupo caso, sendo que os pacientes portadores do alelo *HLA-DBR1*13* apresentaram um risco 7 vezes maior de desenvolver a HAI em relação ao controle e pacientes com o alelo *HLA-DBR1*03* apresentaram risco 3,5 vezes maior de desenvolver a doença que o controle (OR = 7,52 e 3,57 respectivamente $p < 0,05$), alguns estudos ainda demonstraram que a presença de ambos os polimorfismos *HLA-DBR1*13* e *HLA-DBR1*03* no mesmo paciente fizeram o risco de desenvolvimento da doença ser ainda maior do que quando sozinhos (P L Bittencourt et al. 1999). Neste estudo, no entanto, quando os polimorfismos *HLA-DRB1*03* e *HLA-DRB1*13* estavam presentes, mutuamente, em um mesmo paciente, estes não apresentaram um risco significativo para prever o desenvolvimento da HAI (OR= 0,76; $p= 0,81$).

Quando comparado os polimorfismos entre os grupos HAI e CAI, para avaliação da influência destes na evolução da doença, o único capaz de prever uma chance significativamente aumentada em 3 vezes de o paciente portador do polimorfismo evoluir para uma HAI associada a CAI, foi o polimorfismo *HLA-DRB1*13* (OR= 3,96, $p < 0,05$). Estes achados sugerem que a susceptibilidade codificada pela HLA classe II para a HAI está mais próxima do locus DRB1, e

que *HLA-DBR1*13* e *HLA-DBR1*03* conferem predisposição à doença de forma independente, e ainda que o polimorfismo mais associado à evolução da doença é o *HLA-DRB1*13*.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos da população brasileira (P L Bittencourt et al. 1999), argentina (Pando et al. 1999) e norte americana (Albert J. Czaja et al. 2002). Foi observado ainda que o polimorfismo *HLA-DBR1*13* esteve mais presente nos pacientes mais jovens e crianças, com médias de idade inferior a 16 anos (P L Bittencourt et al. 1999; Albert J. Czaja et al. 2002). O estudo de Fainboim 2001 demonstrou ainda a susceptibilidade do polimorfismo *HLA-DBR1*13* de predispor à persistência da infecção pelo vírus da hepatite A. Vergani et al 2014 sugeriram que pode existir um papel potencial para a hepatite A na patogênese da HAI (Albert J. Czaja et al. 2002; Fainboim et al. 2001; Vergani, Liberal, and Mieli-Vergani 2014). Czaja et al 2002 incorporou o alelo *HLA-DBR1*13* nas hipóteses da patogênese da doença.

Um dos principais mecanismos propostos para a susceptibilidade determinada pela molécula HLA às doenças autoimunes, é a ligação seletiva de peptídeos próprios a moléculas MHC associadas a doenças. Baseado nisto, alguns grupos têm investigado aminoácidos comuns na sequência das moléculas HLA traduzidas pelos principais alelos envolvidos na susceptibilidade a HAI. A análise da sequência de aminoácidos comuns transcritos pelos três alelos presentes na maioria dos pacientes anglo-saxônicos com HAI, que são *HLA-DBR1*0301*, *HLA-DBR1*0101* e *HLA-DBR1*0401*, tem revelado uma frequência aumentada da lisina na posição 71 da terceira região da cadeia DR β (P L Bittencourt et al. 1999; P T Donaldson 2004). Esta hipótese, explica a susceptibilidade a doença nos pacientes que apresentaram o polimorfismo *HLA-DBR1*0301*. Entretanto, em outros estudos de associação, os pacientes com predominância do alelo *HLA-DBR1*13* com HAI-1 não apresentaram alteração para este resíduo de lisina (P L Bittencourt et al. 1999).

Como *HLA-DRB1*13* foi associado com o maior risco relativo para a doença, é possível que a lisina na posição 71 não esteja implicada na susceptibilidade à HAI-1 no Brasil (P L Bittencourt et al. 1999). Por outro lado, os alelos *HLA-DRB1*13* e *-DRB1*03* apresentam uma grande homologia de

sequência com outros locais de ligação de peptídeos relevantes. De fato, o gene que codifica a especificidade *HLA-DRB1*03* evoluiu a partir do *DRB1*13* por conversão gênica no haplótipo *HLA-DRB1*13 / DRB3*. Assim, como ambas as moléculas, presentes em 91% dos pacientes brasileiros com HAI-1, compartilham outros resíduos de aminoácidos comuns no sítio da molécula HLA, é possível especular que a predisposição à HAI-1, conferida por ambas as moléculas, poderia refletir a apresentação de auto antígenos hepáticos específicos semelhantes nestas duas moléculas DR diferentes (P L Bittencourt et al. 1999).

Por outro lado, este modelo não se enquadra nos dados da HAI- 1 em adultos da Europa (D.G. Doherty et al. 1994; Strettell et al. 1997) ou da Argentina (Vázquez-García et al. 1998), e parece ser específico apenas para alguns grupos de crianças sul-americanas (Pando et al. 1999). As associações também apresentam uma intrigante semelhança com as associações de HLA para colangite esclerosante primária, uma condição distinta, mas relacionada, em adultos norte-europeus (Peter T Donaldson and Norris 2001; Mieli-vergani and Vergani 2001).

Os polimorfismos *HLA-DRB1*07* e *HLA-DRB1*04* não demonstraram significância estatística à HAI. Estes inclusive, apresentaram uma associação inversamente proporcional com a HAI o que sugeriria que estes polimorfismos poderiam ser protetivos contra a doença, porém sem significância estatística. Outros estudos já tinham demonstrado o polimorfismo *HLA-DRB1*07* atuando como protetor contra a doença, devido a este apresentar uma frequência reduzida nos pacientes estudados (P. T. Donaldson et al. 1991). Porém, o polimorfismo *HLA-DBR1*04* em estudos anteriores na população caucasiana e europeia se apresentou como um fator de risco de 4 a 5 vezes maior para o desenvolvimento da HAI (RR= 3.9 e 4.97) (D.G. Doherty et al. 1994; Strettell et al. 1997). Contudo, no nosso estudo, os dois polimorfismos não apresentaram significância estatística para estas análises. Este fato pode ser explicado pelo tamanho amostral reduzido.

No estudo de Doherty et al. 1994, *HLA-DRB1*04* e *HLA-DRB3*0101* foram identificados como determinantes secundários a susceptibilidade à HAI em pacientes brancos do norte da Europa, este grupo sendo composto de 96 adultos e 23 crianças (D.G. Doherty et al. 1994). Ambos os alelos são

responsáveis pela transcrição do aminoácido lisina residual na posição 71 e a sequência transcrita modificada Leu-Leu-Glu-Gln-Lys-Arg (LLEQKR) modificada da posição 67 para a 72 da cadeia DR β . Além do alelo *HLA-DRB1*0301* que também já foi demonstrado ter aumento significativo em sua frequência para pacientes que apresentam este aminoácido (D.G. Doherty et al. 1994; Peter T Donaldson 2002; Strettell et al. 1997).

O aminoácido residual da posição 71 da molécula DR β localiza-se na ponta da α -hélice apontando para o sulco de ligação ao peptídeo e é um ponto de contato tanto para o peptídeo antigênico, como para o receptor de células T (Brown, et al. 1988). Portanto a DR β Lys71 pode determinar um papel crítico na apresentação de um peptídeo auto-antigênico na HAI (D G Doherty et al. 1994). Esta substituição esteve presente em todos os pacientes positivos para os auto anticorpos contra o receptor de asialoglicoproteína hepática (ASGPR), um auto antígeno específico hepático cujo o qual já se conhece que seus auto anticorpos estão associados a HAI, independente de critérios geográficos (Treichel et al. 1994). Estas afirmativas sugerem um papel da DR β Lys71 em respostas autoimunes a este auto antígeno. Um aminoácido residual na posição DR β 71 responsável por desempenhar um papel protetor mais forte na resposta imune, a arginina, juntamente com a lisina, são ambos aminoácidos básicos. As estruturas moleculares em torno da posição 71 podem predispor ou proteger contra a HAI, o que diferem estas duas funções, são apenas pequenas alterações na conformação da molécula e seus aminoácidos. Estas pequenas substituições "conservadoras", no entanto, são suficientes para alterar significativamente a especificidade do reconhecimento por anticorpos (Hiraiwa et al. 1990) e células T (Lanchbury et al. 1990).

Outros estudos na população brasileira, não encontraram associação do polimorfismo *HLA-DRB1*04* em pacientes com HAI (P L Bittencourt et al. 1999). Estudos japoneses, no entanto, revelaram uma maior frequência de todos os alelos *HLA-DRB1*04* em pacientes adultos com HAI-1, e uma associação secundária com *HLA-DRB1*15* e *HLA-DRB1*16*. O alelo *HLA-DRB1*0405*, também estava fracamente associado com a HAI-1 em adultos na Argentina, e estava associada com a doença aguda no México (D G Doherty 1991; Derek G. Doherty et al. 1992; Peter T Donaldson 2002). Em contraste, não houve aumento significativo na frequência do *HLA-DRB1*04* na população

estudada, como já descrito em outro estudo na mesma população (P L Bittencourt et al. 1999).

Desta forma, pode-se tirar algumas suposições; se o aminoácido Lisina residual na posição 71 e o LLEQR modificado da posição 67 para a 72 da cadeia DR β estivesse presente nessa população, o responsável por esta modificação seria o polimorfismo *HLA-DRB1*03* (Peter T Donaldson 2002). O polimorfismo *HLA-DRB1*04* não é comumente associado a crianças com HAI, como demonstrado por outros trabalhos (P L Bittencourt et al. 1999). E ainda, este polimorfismo poderia ser considerado como um polimorfismo de proteção contra HAI, em pacientes com estas ticas do nosso estudo. Para que estas suposições pudessem ser aceitas, seria necessário um estudo na mesma população com uma casuística maior, composta não somente de crianças e ainda seria necessária a identificação de auto anticorpos anti-ASGPR, para comprovar que estes aminoácidos realmente têm sua sequência alterada em indivíduos com as características da população estudada (Treichel et al. 1994).

Para avaliar se estes polimorfismos seriam capazes de prever a gravidade da HAI, os pacientes foram subdivididos em grupos, de acordo com a forma com que a doença se apresentava clinicamente. Depois, estes pacientes foram submetidos a uma segunda avaliação, para investigar se estes polimorfismos seriam capazes de prever a presença ou ausência de cirrose nos portadores de HAI ou HAI associada a CAI. Nenhuma destas previsões foram estatisticamente significativas para os grupos de pacientes estudados ($p > 0,05$).

Apresentamos uma casuística composta por 43 pacientes, que se subdividiam em portadores de HAI e portadores de HAI associada a CAI. Comparado a outros estudos que apresentaram as mesmas condições e características da população estudada, em sua maioria composta de crianças e predominantemente do sexo feminino, nosso n amostral foi relativamente pequeno (P L Bittencourt et al. 1999; Fainboim et al. 2001; G. V. Gregorio et al. 2001; Pando et al. 1999). Este fato pode explicar o não aparecimento de significância nestas últimas análises e se justifica pela raridade da doença na faixa etária pediátrica.

Segundo Field 2009, na regressão a determinação do tamanho amostral irá depender do tamanho do efeito que se está tentando determinar e de

quanto poder é necessário para este efeito. Ainda é ressaltada uma regra sobre a quantidade de previsores e o tamanho da amostra, podendo-se ter 10 ou 15 dados para cada previsor do modelo (Field 2009). Para os primeiros experimentos, os quais incluem os pacientes e controles, nosso tamanho amostral foi de 100 indivíduos para dois previsores, estes previsores foram a presença ou ausência da doença. Estas análises apresentaram significância estatística, inclusive quando o tamanho amostral foi reduzido para 43, com a finalidade de investigar se os polimorfismos seriam capazes de prever o agravamento da HAI e sua evolução para CAI, foi possível observar significância estatística. Novamente, nesta segunda análise foram incluídos no modelo dois previsores, HAI ou HAI associado a CAI.

Porém, a última análise além de contar com um tamanho amostral reduzido (n= 43), ainda foi avaliada a capacidade de quatro previsores, que eram as formas de apresentação da doença, em quatro variáveis (*HLA-DRB1*04*, *-DRB1*07*, *-DRB1*03* e *-DRB1*13*). Diante do apresentado, um novo estudo seria necessário com uma casuística maior, recrutando-se mais pacientes do grupo caso e controles para que fosse possível avaliar a capacidade destes polimorfismos de prever a gravidade da doença e a presença ou ausência de cirrose na população com as características avaliadas.

6. ARTIGO ORIGINAL

Title: Autoimmune hepatitis and overlap syndrome with cholangitis: analysis of polymorphisms on *HLA-DRB1* gene in children and adolescents

Monique Gervásio, Daniela Valadão, Eleonora Duvre, Luiz Armando De Marco, Alexandre Rodrigues, Debora Marques de Miranda, Priscila Ferri Liu.

A ser submetido para: Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a rare chronic inflammatory liver disease marked by a loss of immunological tolerance to self-antigens. Usually this disease occurs between 10 and 30 years old, being considered rare in children. Comorbidity with autoimmune cholangitis may complicate this condition. Partially, susceptibility to AIH is determined by the presence of genes related to major histocompatibility complex II (MHC II) and most directly to human leukocyte antigen (HLA), in particular allelic variants of DRB1. Few studies have demonstrated the predictive role of polymorphisms in HLA DRB1 in children with AIH and their implications for treatment. The purpose of this study was to describe frequencies of the polymorphisms in HLA gene with relationship with autoimmunity in child and teenagers with autoimmune hepatitis with or without overlap syndrome, comparing both with a healthy control group. This is a prospective study of a cross-sectional cohort of including 43 individuals, 25 diagnosed with AIH type 1 and 18 with AIH type 1 overlap syndrome with autoimmune cholangitis. *HLA-DRB1* locus was performed using PCR-SSP. The polymorphisms evaluated were *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07* and *HLA-DRB1*13*. The mean age at the time of evaluation among participants to the control group had a mean age of 13.92 ± 4.55 years and the case group $15,86 \pm 6,34$. Our results demonstrated that individuals with *HLA-DRB1*13* and *HLA-DRB1*03* polymorphisms have a increased risk of developing. Children who have the disease with *HLA-DRB1*13* presented a significantly increased to develop in the autoimmune cholangitis (OR = 3.96, p = 0.04). The *HLA-DRB1*04* and *HLA-DRB1*07* have not no association with the AIH and autoimmune cholangitis. This work contributed to the investigation of the main polymorphisms in the *HLA-DRB1* gene responsible associated with AIH with or without cholangitis in the Brazilian population.

Keywords: Autoimmune hepatitis, autoimmune cholangitis, HLA-DRB1, polymorphism

Introduction

Autoimmune hepatitis (AIH) is a rare chronic inflammatory liver disease marked by a loss of immunological tolerance to self-antigens. It is more frequent in females being characterized by chronic hepatitis (based on histologic examination) in the absence of a known cause. Serologically this courses with high levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) hypergammaglobulinemia, and production of autoantibodies¹⁻³. Usually, this disease occurs between 10 and 30 years old², is considered rare in children. Clinically can be asymptomatic to a cause of hepatic failure^{2, 4}. Comorbidity with autoimmune cholangitis may complicate this condition³.

Etiology of AIH is unknown. As any complex disorder, it is expected one or more genes that interact with environmental factors resulting in disease^{2,5,6}. Partially, susceptibility to AIH is determined by the presence of genes related to major histocompatibility complex II (MHC II) and most directly to human leukocyte antigen (HLA) in the region on the short arm of chromosome 6, in particular, allelic variants of DRB1⁷⁻¹⁰. Among white North American and Northern European individuals, AIH has been associated with DRB1*0301 and DRB1*0401¹⁴⁻¹⁷. In children, HLA-DRB1*1301 is related to susceptibility to AIH, determining the prognosis and response to treatment^{10,18}. Czaja et al. concluded that patients with HLA-DRB1*03 were younger at disease onset than patients with HLA-DRB1*04, and they also had worse responses to treatment with corticosteroids. Patients expressing HLA DRB1*04 were more often women, with a greater risk of comorbidity with other immune diseases and with good responses to corticosteroids¹⁸.

In contrast, MHC II antigens have shown significant heterogeneity among different ethnicities. However, some generalizations look like possible, such as patients with HLA-DRB1*13 and -DRB1*03 seems to have an earlier onset of disease compared to other patients¹⁷⁻²⁰. Few studies have demonstrated the predictive role of polymorphisms in HLA DRB1 in children with AIH and their implications for treatment. The purpose of this study was to describe frequencies of the polymorphisms in HLA gene with a relationship with autoimmunity in child and teenagers with autoimmune hepatitis with or without overlap syndrome, comparing both with a healthy control group.

Patients and methods

Patients

This is a prospective study of a cross-sectional cohort of including 43 individuals, 25 diagnosed with AIH type 1 and 18 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 a follow-up according to clinical protocol and adherence to treatment, were enrolled. It was also assessed a group of healthy control individuals (n = 48) considered healthy in the routine medical evaluation. Exclusion criteria were personal or family history of autoimmune diseases, and presented age and gender similar to the selected case group above.

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 patients or/and their representatives.

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 (Alvarez F et al. 1999; Mieli-Vergani G. et al. 2009). The diagnosis of overlap syndrome was based on the presence of abnormalities in the biliary tract, such as stenosis and/or dilatation of the inter- 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 of 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 positive AML and type 2, when the anti-LKM1 was positive) and the severity of AIH or AIH associated with autoimmune cholangitis (overlap syndrome).

All other liver diseases were tested and excluded, such as infectious hepatitis, Wilson's disease and deficiency of alpha-1-antitrypsin. All patients performed a liver biopsy for disease staging. Overlap with cholangitis was confirmed with the magnetic resonance of hepatic biliary tract and histological findings.

Extraction of DNA and PCR-SSP

Genomic DNA was extracted using a saline method from the total blood (Lahiri DK and Schnabel B., 1993). The DNA concentration was determined by UV spectrophotometer and adjusted to 50ng/uL subsequently. *HLA-DRB1* locus was performed using polymerase chain reaction and sequence-specific primers (PCR-SSP), based on methods previously described (Zetterquist and Olerup 1992). The polymorphisms evaluated were *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*04*, *HLA-DRB1*07* and *HLA-DRB1*13*. The alleles sequence specific primers were designed based on the reference sequences from Bo Diao et al, 2014; Zetterquist and Olerup 1992; Živković, et al 2009, and confirmed from GenBank database. The primers were synthesized by Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Integrated DNA Technologies (IDT) and Alpha DNA.

Every PCR reaction tube contains 50 ng genomic DNA to be tested, 0.5 U Taq polymerase, 0.5 mmol of dNTP, 1.5mmol of MgCl₂, 0,2 mmol SSP of each *HLA-DRB1* alleles. Conditions for PCR: denaturation at 95°C for 10 min; annealing temperature was specific to each primer for 30 s; elongation at 72°C for 1 min, 35 cycles. PCR product was analyzed by 1% agarose gel ethidium bromide was contained electrophoresis (100V, 400 mA, 60 min). As an indicator and DNA band appeared under UV was used ethidium bromide. In silver-stained 6.5%, polyacrylamide gel was visualized only Two polymorphisms specific (*HLA DRB1* 04* and *HLA- DRB1 0701/0702*).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using SPSS 24® program. The descriptive analysis, using a non-parametric test Mann-Whitney to the age of the individuals and variables qualitative like gender, chi-square was used.

The frequency of the polymorphism, the risk to developed the disease through the polymorphisms presence (odds ratio OR), and if the polymorphism was capable of predicting the development of cirrhosis, were performed by logistic regression. We further investigated if these polymorphisms could predict AIH severity through clinical forms of disease presentation. Each type of presentation was given a number, being four types of presentation, the severity of illness varied from less severe (number 1) to the most severe cases (number 4). To investigate the ability of these polymorphisms to predict the type of disease presentation the multiple linear logistic regression tests was performed. For all comparisons, the level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Individuals' description

The sample consisted of 100 individuals, subdivided into 25 patients with AIH diagnosis, 18 with autoimmune cholangitis diagnosis, totaling 43 patients in the group of cases and another 57 healthy controls. The frequency of individuals in the control group for males was 35.1% and for females 64.9%. Among the people in the case group for males, the frequency was 32.6% and for the female sex was 67.4%. There were no significant differences between the groups' cases and controls for gender, $X_2(1) = 0.79$, ($p > 0.05$). The mean age at the time of evaluation among participants to the control group had a mean age of 13.92 ± 4.55 years and the case group 15.86 ± 6.34 . There is no age difference between the control and the case groups ($U = 887$, $p = 0.11$, $r = -0.16$).

The frequencies of clinical presentation were similar between the two groups of patients ($X(3) = 3.32$, $p = 0.34$). In the AIH group, the disease was mainly acute or chronic. While the autoimmune cholangitis group had a higher frequency of individuals with the asymptomatic or chronic disease. This group

also presented a higher frequency of patients with hepatic impairment than the group with AIH, demonstrating that the disease has a more severe form in the autoimmune cholangitis groups. However, none clinical presentation showed statistically significant differences ($p > 0.05$).

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

	Autoimmune hepatitis (<i>n</i> = 25 patients)	Autoimmune hepatitis associated with autoimmune cholangitis (<i>n</i> = 18 patients)	Statistical significance (<i>p</i> value)
Median of age at clinical onset (years)	9,12 (± 3,11)	8,52 (± 3,30)	0,61
Gender (females <i>n</i>)	19 (76%)	10 (55,5 %)	0,15
Forms of presentation (number of patients)			
Liver failure	2 (8%)	3 (16,7%)	0,38
Acute onset	8 (32%)	2 (11,1%)	0,10
Chronic liver disease	12 (48%)	9 (50%)	0,89
Asymptomatic	3 (12%)	4 (22,2%)	0,37

Polymorphisms' analyses

A comparison was made about the frequency of each polymorphism among the AIH, AIH + OS and control groups. From this statistic perspective, it was possible to observe that individuals with HLA-DRB1*13 polymorphisms have a 7-fold increased risk of developing AIH (OR = 7.2, $p < 0.001$) and HLA-DRB1* 03 polymorphism A 3.5-fold higher risk of developing AIH (OR=3.57; $p < 0.01$) than disease-free individuals. For patients in the HLA-DRB1*07 gene, an inversely proportional association was found, which would mean that this polymorphism would be a protective factor against AIH. However, this risk was not statistically significant (OR = 0, 21, $p = 0.057$). The HLA-DRB1*0401

polymorphism had a protection association with the individuals in the studied sample with no statistical significance (OR = 0.37, p = 0.64).

Table 2 -Logistic regression from polymorphisms HLA-DRB1 on groups cases and control

SNP	B (EP)	OR (95% IC)	P
DRB1*03	1.27 (0,51)	3.57 (1.31 – 9.73)	0.013
DRB1*07	-1.56 (0.82)	0.21 (0.04 – 1.04)	0.057
DRB1*13	2.02 (0.50)	7.52 (2.83 – 19.94)	0.0001

Note: R2 = 0.95 (Hosmer and Lemeshow), 0.28 (Cox and Snell), 0.37 (Nagelkerke), X2 (3) of Model = 32,33, DRB1 * 04 - variable removed in step 3 of 5. Legend: B- beta value; EP- Standard error; OR- Odds ratio; IC- Confidence Interval.

We also compared the polymorphisms between the groups of patients presenting AIH and AIH associated with autoimmune cholangitis to assess whether polymorphisms were able to influence the evolution of the disease. In this analysis, only HLA-DRB1 * 13 presented a significantly increased chance of an almost 4-fold increase in the autoimmune cholangitis (OR = 3.96, p = 0.04).

Table 3 – Logistic regression from polymorphisms HLA-DRB1 on groups AIH and overlap syndrome

SNP	B (EP)	OR (95% IC)	P
DRB1*13	1.38 (0,67)	3.96 (1.07 – 14.61)	0.04

Note: R2 = 0.09 (Cox and Snell), 0.13 (Nagelkerke), X2 (1) of the Model = 4.481, DRB1 * 03- variable removed in step 5 of 7, DRB1 * 04- variable removed in step 4 of 7, DRB1 * 07- variable removed in step 2 of 7. Legend: B- beta value; EP- Standard error; OR- Odds ratio; IC- Confidence Interval.

To assess if the polymorphisms could predict clinical presentations of AIH, the individuals in the case group were subdivided into groups according to how AIH was clinically present (n = 43). These polymorphisms together accounted for only 19% of the disease presentation types (R2 = 0.194). The

difference between R2 and R2 adjusted was 0.085 (0.194-0.109), which means that if the model were derived from the population instead of a sample, it would explain only 8.5% of the variance of the types of presentation of the disease.

The presence of HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*03 and HLA-DRB1*07 polymorphisms is associated with a less aggressive disease (-0.36, -0.44 and -0.91, respectively). In asymptomatic AIH or chronic hepatitis, HLA-DRB1*07 is the strongest association with disease presentation (-0.91). Individuals positive for HLA-DRB1*04 polymorphism have an increased risk of developing acute hepatitis or hepatic failure due to AIH. However, none of these predictions were statistically significant ($p > 0.05$).

Table 4 – Multiple linear regression from the groups of the clinical forms of presentation

SNP	B (EP)	β	P
DRB1*13	-0.36 (0,28)	-0.20	0.20
DRB1*03	-0.44 (0.26)	-0.25	0.10
DRB1*07	- 0.91 (0.51)	-0.26	0.08
DRB1*04	0.23 (0.39)	0.09	0.55

Note: $R_2 = 0.03$ for step 1; $\Delta R_2 = 0.068$ for step 2; $\Delta R_2 = 0.12$ for step 3; $\Delta R_2 = 0,11$ for step 4. Legend: B- beta value; EP- Standard error; OR- Odds ratio; IC- Confidence Interval.

We also evaluated if these polymorphisms could predict the presence or absence of cirrhosis in patients in the case group. None of the HLA-DRB1 genes were able to predict the development of cirrhosis in individuals affected by AIH with or without autoimmune cholangitis ($p > 0.05$).

Discussion

The age and gender of the case and control group were similar, which demonstrates certain comparability of the groups. High frequency of female adolescents is quite constant in different studies ^{24,25}. Among the patient groups, ages were similar, and the age of onset of symptoms was between 8

and nine years (see Table 1). The four forms of presentation of the disease were similar in patient groups. Other studies describe a more severe disease when there is installed the comorbidity of autoimmune cholangitis^{25,26}.

Our results demonstrate that susceptibility to AIH may be linked to HLA-DBR1*13 and HLA-DBR1*03 polymorphisms in the Brazilian population. Both HLA-DBR1*13 and HLA-DBR1*03 alleles were present in most patients in the case group. Patients with the *HLA-DBR1*13* allele had a 7-fold increased risk of developing AIH about control, and the HLA-DBR1*03 allele showed a 3-fold greater risk of developing the disease than the control (OR = 7.52 and 3.57 respectively, and $p < 0.05$ to the both). Some studies have further demonstrated that the presence of both polymorphisms, HLA-DBR1*13, and HLA-DBR1*03, in the same patient made the risk of developing the disease even higher showing an additive impact²⁷. However, when the *HLA-DRB1*03* and *HLA-DRB1*13* polymorphisms were mutually present in one patient, they did not present a significant risk for predicting the development of AIH (OR = 0.76; = 0.81). When comparing the polymorphisms between the AIH and autoimmune cholangitis groups, the only one able to predict a 3-fold increased chance to present an AIH associated with autoimmune cholangitis was the polymorphism *HLA-DRB1*13* (OR = 3.96, $p < 0.05$). These findings suggest that the susceptibility coded by HLA class II for AIH is closer to the *DRB1* locus and that *HLA-DBR1*13* and *HLA-DBR1*03* confer disease predisposition independently, and although the polymorphism associated with susceptibility is *HLA-DRB1*13*.

These results are in agreement with other Brazilian studies²⁷, Argentina²⁸, and North American¹⁸. It was also observed that HLA-DBR1*13 polymorphism was more frequent in youngsters, with a mean age of fewer than 16 years^{18,27}. The Fainboim 2001²⁹ study further demonstrated the susceptibility of HLA-DBR1*13 polymorphism to predispose to a persistent hepatitis A virus infection. Czaja et al. 2002¹⁸ incorporated the HLA-DBR1*13 allele into the hypotheses of disease pathogenesis.

One of the main proposed mechanisms for the susceptibility determined by the HLA molecule to autoimmune diseases is the selective attachment of peptides to MHC molecules associated with diseases. Based on this, some

groups have investigated common amino acids following the HLA molecules translated by the major alleles involved in AIH susceptibility. Analysis of the common amino acid sequence transcribed by the three alleles present in most Anglo-Saxon AIH patients, which are HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0101, and HLA-DRB1*0401, have shown an increased frequency of lysine at position 71 of the third region of the DR β chain^{8,27}. This hypothesis explains the susceptibility to disease in patients who presented the HLA-DRB1*0301 polymorphism. However, in other association studies, patients with predominance of the HLA-DRB1*13 allele with AIH-1 did not undergo the present alteration of this lysine residue²⁷.

As DRB1*13 was associated with the highest relative risk for the disease, it is possible that a lysine at position 71 is not implicated in susceptibility to AIH-1 in Brazil²⁷. On the other hand, the DRB1*13 and DRB1*03 alleles display high sequence homology to other relevant peptide binding sites. In fact, the gene encoding the DRB1*03 specificity evolved from DRB1*13 by gene conversion in the HLA-DRB1*13 / DRB3 haplotype. Thus, as both molecules are present in 91% of Brazilian AIH-1 patients, other common amino acid residues in the HLA-1 molecule site are shared²⁷. However, this model does not fit the data of AIH-1 in European adults^{15,16} or Argentina²³ and seems to be specific only for some Groups of South American children²⁸. The associations also present an intriguing similarity to the HLA associations for primary sclerosing cholangitis, a distinct but related condition in North American adults^{26,30}.

The HLA-DRB1*07 and HLA-DRB1*04 polymorphisms did not demonstrate statistical significance for association with AIH. Other studies have shown the HLA-DRB1*07 polymorphism acting as a protector against the disease because it presents a reduced frequency in the studied patients³¹. However, the HLA-DRB1*04 polymorphism in previous research in the Caucasian and European population showed as a 4 to 5-fold higher risk factor for the development of AIH (RR = 3.9 and 4.97)^{15,16}. In this study, the HLA-DRB1*04 and HLA-DRB1*07 have not any statistical significance.

Other studies in the Brazilian population do not find an association of HLA-DRB1*04 polymorphism in patients with AIH²⁷. Japanese studies,

however, revealed a higher frequency of all HLA-DRB1*04 alleles in adult AIH-1 patients, and a secondary association with HLA-DRB1*15 and HLA-DRB1*16. The HLA-DRB1*0405 allele was also poorly associated with AIH-1 in adults in Argentina and was associated with the acute disease in Mexico^{18,33,34}. There was no significant increase in the frequency of HLA-DRB1*04 in the population studied, or any Brazilian population²⁷.

To assess whether these polymorphisms would predict the clinical presentation, the patients were subdivided into groups according to the way the disease presented clinically. Then, these patients underwent a second evaluation to investigate whether these polymorphisms would be able to predict the presence or absence of cirrhosis in patients with AIH or AIH associated with overlap syndrome (autoimmune cholangitis). None of these predictions were statistically significant for the groups of patients studied ($p > 0.05$).

We present a case series composed of 43 patients, who were subdivided into AIH and AIH associated with overlap syndrome. Since this disorder is quite rare among children, the sample size is a real limitation for any assumption. According to Field 2009, in regression, the determination of sample size will depend on the size of the effect being attempted and how much power is needed for this effect. A rule about the number of predictors and the size of the sample is still highlighted, it is possible to have 10 or 15 data for each model predictor³². For the first experiments, which included patients and controls, our sample size was 100 individuals for two predictors; these predictors were the presence or absence of the disease. These analyses were statistically significant, even when the sample size was reduced to 43, to investigate whether the polymorphisms would predict AIH aggravation and its evolution to autoimmune cholangitis, it was possible to observe statistical significance. Again, in this second analysis, two predictors, AIH or AIH associated with autoimmune cholangitis, were included in the model.

However, the last analysis in addition to having a reduced sample size ($n = 43$), the ability of four predictors, which were the presentation of the disease, was evaluated in four variables (*DRB1 * 04*, *DRB1 * 07*, *DRB1 * 03* and *DRB1 * 13*). In view of the presented, a new study would be necessary to a larger

sample, recruiting more patients from the case group and controls so that it was possible to evaluate the ability of these polymorphisms to predict the degree of aggravation of the disease and the presence or absence of cirrhosis in the population with the evaluated characteristics.

Conclusion

AIH and its association with cholangitis autoimmune are a challenging condition for the patient and the scientific community. As a rare disease, the main limitation of this study was the reduced number of patients evaluated with AIH and this condition associated with cholangitis.

However, this work contributed to the investigation of the main polymorphisms in the *HLA-DRB1* gene responsible associated with AIH with or without cholangitis in the Brazilian population. It has been shown that children with *HLA-DRB1*03* and *HLA-DRB1*13* polymorphisms are more likely to be affected with AIH, and children with *HLA-DRB1*13* polymorphism are still likely to develop the association with autoimmune cholangitis.

References

1. Manns, M. P. *et al.* Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* **51**, 2193–2213 (2010).
2. Vergani, D., Liberal, R. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Liver Immunol. Princ. Pract.* **8**, 320–329 (2014).
3. Liu, P. M. F., de Miranda, D. M., Fagundes, E. D. T., Ferreira, A. R. & Silva, A. C. S. Autoimmune hepatitis in childhood: The role of genetic and immune factors. *World J. Gastroenterol.* **19**, 4455–4463 (2013).
4. Czaja, A. J., Carpenter, H. A. & Moore, S. B. HLA DRB1*13 as a risk factor for type 1 autoimmune hepatitis in North American patients. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 522–528 (2008).
5. De Boer, Y. S. *et al.* Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1. *Gastroenterology* **147**, 443–452.e5 (2014).
6. Zachou, K. *et al.* Review article: Autoimmune hepatitis - Current management and challenges. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38**, 887–913 (2013).
7. Donaldson, P. T. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin. Liver Dis.* **22**, 353–64 (2002).
8. Donaldson, P. T. Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis. *Gut* **53**, 599–608 (2004).
9. Oo, Y. H., Hubscher, S. G. & Adams, D. H. Autoimmune hepatitis: New paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatology International* **4**, 475–493 (2010).
10. Tang, J., Zhou, C., Zhang, Z. J. & Zheng, S. Sen. Association of polymorphisms in non-classic MHC genes with susceptibility to autoimmune hepatitis. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* **11**, 125–131 (2012).
11. Spatz, M. A. Genetics Home Reference. *J. Med. Libr. Assoc.* **92**, 282–283 (2004).
12. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology.* (2015).
13. Heneghan, M. A., Yeoman, A. D., Verma, S., Smith, A. D. & Longhi, M. S.

- Autoimmune hepatitis. *Lancet* **382**, 1433–1444 (2013).
14. Donaldson, P. T. *et al.* Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: Human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* **13**, 701–706 (1991).
 15. Strettell, M. D. J. *et al.* Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* **112**, 2028–2035 (1997).
 16. Doherty, D. G. *et al.* Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* **19**, 609–15 (1994).
 17. Montano-Loza, A. J., Carpenter, H. a & Czaja, A. J. Clinical significance of HLA DRB103-DRB104 in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int.* **26**, 1201–1208 (2006).
 18. Czaja, A. J. *et al.* Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J. Hepatol.* **37**, 302–308 (2002).
 19. Czaja, A. J. & Manns, M. P. Advances in the Diagnosis, Pathogenesis, and Management of Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology* **139**, 58–72.e4 (2010).
 20. Goldberg, A. C. *et al.* Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: Identifying the major susceptibility locus. *Hum. Immunol.* **62**, 165–169 (2001).
 21. Fortes Mdel, P. *et al.* Genetic contribution of major histocompatibility complex class II region to type 1 autoimmune hepatitis susceptibility in Venezuela. *Liver Int.* **27**, 1409–1416 (2007).
 22. Ota, M. *et al.* geneO â€™ es. 49–55 (1992).
 23. Vázquez-García, M. N. *et al.* MHC class H sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* **28**, 985–990 (1998).
 24. Gregorio, G. V. *et al.* Autoimmune hepatitis in childhood: A 20-year experience. *Hepatology* **25**, 541–547 (1997).
 25. Rojas, C. P., Bodicharla, R., Campuzano-Zuluaga, G., Hernandez, L. & Rodriguez, M. M. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis in children and adolescents. *Fetal Pediatr. Pathol.* **33**, 202–9 (2014).

26. Gregorio, G. V. *et al.* Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: A 16-year prospective study. *Hepatology* **33**, 544–553 (2001).
27. Bittencourt, P. L. *et al.* Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 1906–1913 (1999).
28. Pando, M. *et al.* Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* **30**, 1374–80 (1999).
29. Fainboim, L. *et al.* Protracted, but not acute, hepatitis A virus infection is strongly associated with HLA-DRB*1301, a marker for pediatric autoimmune hepatitis. *Hepatology* **33**, 1512–1517 (2001).
30. Mieli-vergani, G. & Vergani, D. Sclerosing cholangitis in the paediatric patient. **15**, 681–690 (2001).
31. Donaldson, P. T. *et al.* Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: Human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* **13**, 701–706 (1991).
32. Field, A. *Discovering Statistics Using SPSS. International Statistical Review* **3**^o, (2009).
33. Doherty, D. G. H L A - D R B A N D D Q B T Y P I N G B Y A C O M B I N A T I O N O F S E R O L O G Y , R E S T R I C T I O N F R A G M E N T L E N G T H P O L Y M O R P H I S M A N A L Y S I S A N D O L I G O N U C L E O T I D E P R O B I N G . 111–124 (1991).
34. Doherty, D. G., Vaughan, R. W., Donaldson, P. T. & Mowat, A. P. HLA DQA, DQB, and DRB genotyping by oligonucleotide analysis: distribution of alleles and haplotypes in British caucasoids. *Hum. Immunol.* **34**, 53–63 (1992).

7. CONCLUSÃO

A HAI e sua associação com a CAI são condições raras e desafiadoras para o paciente e a comunidade científica. Com estas descobertas pode-se desenvolver novas formas de diagnóstico capazes de prever o aparecimento da doença e o desenvolvimento de sua forma em associação à colangite, a CAI. Ainda não foram conhecidos trabalhos na população brasileira que fizeram estudos semelhantes somente com a população pediátrica, como foi o nosso caso.

A principal limitação deste trabalho foi o número reduzido de pacientes avaliados com HAI e esta condição associada a colangite. Tal número se justifica pela raridade da doença na faixa etária pediátrica. Tendo em vista os achados relevantes aqui descritos não acreditamos que este fato diminui a importância deste estudo.

Este trabalho contribuiu para a investigação dos principais polimorfismos no gene *HLA-DRB1* responsáveis pelo acometimento desta condição nos pacientes pediátricos na população brasileira. Foi demonstrado que as crianças portadoras dos polimorfismos *HLA-DRB1*03* e *HLA-DRB1*13*, têm mais chances de serem acometidas com a HAI e, as crianças portadoras desta doença que apresentam o polimorfismo *HLA-DRB1*13* apresentam ainda chances de desenvolver a associação com a CAI.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, Abul K, Andrew H Lichtman, and Shiv Pillai. 2015. *Cellular and Molecular Immunology*. 8^a.

Alvarez, F. et al. 1999. "International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of Criteria for Diagnosis of Autoimmune Hepatitis." *Journal of Hepatology* 31(5): 929–38.

Assis, David N. et al. 2016. "A Macrophage Migration Inhibitory Factor Polymorphism Is Associated with Autoimmune Hepatitis Severity in US and Japanese Patients." *Digestive Diseases and Sciences*.
<http://link.springer.com/10.1007/s10620-016-4322-z>.

Bittencourt, P L et al. 1999. "Genetic Heterogeneity in Susceptibility to Autoimmune Hepatitis Types 1 and 2." *American Journal of Gastroenterology* 94(7): 1906–13.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10406258%5Cnhttp://www.nature.com/ajg/journal/v94/n7/pdf/ajg1999450a.pdf.

Bittencourt, Paulo Lisboa et al. 2015. "Brazilian Society of Hepatology Recommendations for the Diagnosis and Management of Autoimmune Diseases of the Liver." *Arquivos de Gastroenterologia* 52: 15–46.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032015000500015&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

Boberg KM1, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. 1998. "Incidence and Prevalence of Primary Biliary Cirrhosis, Primary Sclerosing Cholangitis, and Autoimmune Hepatitis in a Norwegian Population." *Scand J Gastroenterol*. 1: 99–103. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9489916>.

De Boer, Ynto S. et al. 2014. "Genome-Wide Association Study Identifies Variants Associated with Autoimmune Hepatitis Type 1." *Gastroenterology* 147(2): 443–452.e5. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.022>.

Brown, J H et al. 1993. "Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1." *Nature* 364(6432): 33–39.

———. 2015. "Pillars Article: Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature*. 1993. 364: 33-39." *J Immunol* 194(1): 5–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25527791>.

Corte, C Della et al. 2016. "Pediatric Liver Diseases: Current Challenges and Future Perspectives." *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 10(2): 255–65.

Czaja, A J et al. 1997. "Associations between Alleles of the Major Histocompatibility Complex and Type 1 Autoimmune Hepatitis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25(2): 317–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9021941>.

Czaja, Albert J. et al. 2002. "Clinical Distinctions and Pathogenic Implications of Type 1 Autoimmune Hepatitis in Brazil and the United States." *Journal of Hepatology* 37(3): 302–8. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827802001824>.

Czaja, Albert J., Herschel A. Carpenter, and S. Breannan Moore. 2008. "HLA DRB1*13 as a Risk Factor for Type 1 Autoimmune Hepatitis in North American Patients." *Digestive Diseases and Sciences* 53(2): 522–28.

Czaja, Albert J., and Deborah K. Freese. 2002. "Diagnosis and Treatment Autoimmune Hepatitis." *Hepatology* 36(2): 479–97.

Czaja, Albert J., and Michael P. Manns. 2010. "Advances in the Diagnosis, Pathogenesis, and Management of Autoimmune Hepatitis." *Gastroenterology* 139(1): 58–72.e4. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.053>.

Dalekos, George N et al. 2008. "Simplified Criteria for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis '." : 169–76.

Diao, Bo et al. 2014. "The Association of HLA-DRB1 Alleles and Drug Use with HIV Infection in a Chinese Han Cohort." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 18(1): 82–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.04.007>.

Doherty, D.G. et al. 1994. "Allelic Sequence Variation in the HLA Class II Genes and Proteins in Patients with Autoimmune Hepatitis." *Hepatology* 19(3).

Doherty, D G. 1991. "H L A - D R B A N D D Q B T Y P I N G B Y A C O M B I N A T I O N O F S E R O L O G Y , R E S T R I C T I O N F R A G M E N T L E N G T H P O L Y M O R P H I S M A N A L Y S I S A N D O L I G O N U C L E O T I D E P R O B I N G ." : 111–24.

———. 1994. "Allelic Sequence Variation in the HLA Class II Genes and Proteins in Patients with Autoimmune Hepatitis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 19(3): 609–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119685>.

Doherty, Derek G. 2016. "Immunity, Tolerance and Autoimmunity in the Liver: A Comprehensive Review." *Journal of Autoimmunity* 66: 60–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.020>.

Doherty, Derek G., Robert W. Vaughan, Peter T. Donaldson, and Alex P. Mowat. 1992. "HLA DQA, DQB, and DRB Genotyping by Oligonucleotide Analysis: Distribution of Alleles and Haplotypes in British Caucasoids." *Human Immunology* 34(1): 53–63.

Donaldson, P. T. et al. 1991. "Susceptibility to Autoimmune Chronic Active Hepatitis: Human Leukocyte Antigens DR4 and A1-B8-DR3 Are Independent Risk Factors." *Hepatology* 13(4): 701–6.

Donaldson, P T. 2004. "Genetics of Liver Disease: Immunogenetics and Disease Pathogenesis." *Gut* 53(4): 599–608. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1773998&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Donaldson, Peter T. 2002. "Genetics in Autoimmune Hepatitis." *Seminars in liver disease* 22(4): 353–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447707> (August 4, 2016).

Donaldson, Peter T. et al. 1991. "Susceptibility to Autoimmune Chronic Active Hepatitis: Human Leukocyte Antigens DR4 and A1-B8-DR3 Are Independent Risk Factors." *Hepatology* 13(4): 701–6.

Donaldson, Peter T, and Suzanne Norris. 2001. "Immunogenetics in PSC." 15(4): 611–27.

Fainboim, L et al. 2001. "Protracted, but Not Acute, Hepatitis A Virus Infection Is Strongly Associated with HLA-DRB*1301, a Marker for Pediatric Autoimmune Hepatitis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33(6): 1512–17.

Field, Andy. 2009. 3^o International Statistical Review *Discovering Statistics Using SPSS*.
http://sro.sussex.ac.uk/38823/%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1111/insr.12011_21.

Goldberg, Anna Carla et al. 2001. "Analysis of HLA Haplotypes in Autoimmune Hepatitis Type 1: Identifying the Major Susceptibility Locus." *Human Immunology* 62(2): 165–69.

Gregorio, G. V. et al. 2001. "Autoimmune Hepatitis/sclerosing Cholangitis Overlap Syndrome in Childhood: A 16-Year Prospective Study." *Hepatology* 33(3): 544–53.

Gregorio, Germana V. et al. 1997. "Autoimmune Hepatitis in Childhood: A 20-Year Experience." *Hepatology* 25(3): 541–47.

Heneghan, Michael A. et al. 2013. "Autoimmune Hepatitis." *The Lancet* 382(9902): 1433–44. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62163-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62163-1).

Hiraiwa, a et al. 1990. "Structural Requirements for Recognition of the HLA-Dw14 Class II Epitope: A Key HLA Determinant Associated with Rheumatoid Arthritis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(20): 8051–55.

Josefowicz, S Z, L F Lu, and A Y Rudensky. 2012. "Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function." *Annu Rev Immunol* 30: 531–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224781>.

Krawitt, Edward L. 2006. "Autoimmune Hepatitis." *N Eng J Med* 354(1): 54–66.

Lanchbury, Jerry S S, Margaret A. Hall, Kenneth I. Welsh, and Gabriel S. Panayi. 1990. "Sequence Analysis of HLA-DR4B1 Subtypes: Additional First

Domain Variability Is Detected by Oligonucleotide Hybridization and Nucleotide Sequencing.” *Human Immunology* 27(2): 136–44.

Liberal, Rodrigo, Giorgina Mieli-Vergani, and Diego Vergani. 2016. “Contemporary Issues and Future Directions in Autoimmune Hepatitis.” *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 4124(June): 1–12. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2016.1193004>.

Lim, Kie N., Roberto L. Casanova, Thomas D. Boyer, and Christine Janes Bruno. 2001. “Autoimmune Hepatitis in African Americans: Presenting Features and Response to Therapy.” *American Journal of Gastroenterology* 96(12): 3390–94.

Lim, Young Suk et al. 2008. “Susceptibility to Type 1 Autoimmune Hepatitis Is Associated with Shared Amino Acid Sequences at Positions 70-74 of the HLA-DRB1 Molecule.” *Journal of Hepatology* 48(1): 133–39.

Liu, Priscila Menezes Ferri et al. 2013. “Autoimmune Hepatitis in Childhood: The Role of Genetic and Immune Factors.” *World Journal of Gastroenterology* 19(28): 4455–63.

Manns, Michael P. et al. 2010. “Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis.” *Hepatology* 51(6): 2193–2213.

McFarlane, Ian G. 2002. “Autoimmune Hepatitis: Diagnostic Criteria, Subclassifications, and Clinical Features.” *Clinical Liver Disease* 6(3): 605–21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362570>.

Mieli-vergani, Giorgina, and Diego Vergani. 2001. “Sclerosing Cholangitis in the Paediatric Patient.” 15(4): 681–90.

Mills, Kingston H G. 2004. “Regulatory T Cells: Friend or Foe in Immunity to Infection?” *Nature reviews. Immunology* 4(11): 841–55.

Montano-Loza, Aldo J, Herschel a Carpenter, and Albert J Czaja. 2006. “Clinical Significance of HLA DRB103-DRB104 in Type 1 Autoimmune Hepatitis.” *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the*

Liver 26(10): 1201–8.

Ota, Masao et al. 1992. “geneO â€™ Es.” : 49–55.

Pando, M et al. 1999. “Pediatric and Adult Forms of Type I Autoimmune Hepatitis in Argentina: Evidence for Differential Genetic Predisposition.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 30(6): 1374–80.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573514>.

Primo, J. et al. 2004. “Incidencia Y Prevalencia de Hepatitis Autoimmune En El Área Sanitaria Del Hospital de Sagunto.” *Gastroenterología y Hepatología* 27(4): 239–43. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S021057050370452X>.

Rojas, Claudia Patricia et al. 2014. “Autoimmune Hepatitis and Primary Sclerosing Cholangitis in Children and Adolescents.” *Fetal and pediatric pathology* 33(4): 202–9.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4086229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Senaldi, G et al. 1992. “Immunohistochemical Features of the Portal Tract Mononuclear Cell Infiltrate in Chronic Aggressive Hepatitis.” *Archives of disease in childhood* 67(12): 1447–53.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1793990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Stephens, Richard et al. 1999. “Gene Organisation, Sequence Variation and Isochore Structure at the Centromeric Boundary of the Human MHC.” *J Mol Biol* 291(4): 789–99.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10452889.

Strettell, M. D J et al. 1997. “Allelic Basis for HLA-Encoded Susceptibility to Type 1 Autoimmune Hepatitis.” *Gastroenterology* 112(6): 2028–35.

Than, Nwe Ni, Hannah C. Jeffery, and Ye H. Oo. 2016. “Autoimmune Hepatitis: Progress from Global Immunosuppression to Personalised Regulatory T Cell Therapy.” *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2016.

Thiele, Dwain L. 2005. "Autoimmune Hepatitis." *Clinics in Liver Disease* 9(4): 635–46.

Treichel, Ulrich et al. 1994. "Demographics of Anti-Asialoglycoprotein Receptor Autoantibodies in Autoimmune Hepatitis." *Gastroenterology* 107(3): 799–804.

Umemura, Takeji et al. 2014. "Human Leukocyte Antigen Class II Haplotypes Affect Clinical Characteristics and Progression of Type 1 Autoimmune Hepatitis in Japan." *PLoS ONE* 9(6).

Umemura, Takeji, and Masao Ota. 2015. "Genetic Factors Affect the Etiology, Clinical Characteristics and Outcome of Autoimmune Hepatitis." *Clinical Journal of Gastroenterology* 8(6): 360–66.

Vázquez-García, Miriam Nohemí et al. 1998. "MHC Class H Sequences of Susceptibility and Protection in Mexicans with Autoimmune Hepatitis." *Journal of Hepatology* 28(6): 985–90.

Vergani, D., R. Liberal, and G. Mieli-Vergani. 2014. "Autoimmune Hepatitis." *Liver Immunology: Principles and Practice* 8(6): 320–29. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2011.69>.

Zachou, K. et al. 2013. "Review Article: Autoimmune Hepatitis - Current Management and Challenges." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 38(8): 887–913.

Zetterquist, Henrik, and Olle Olerup. 1992. "Amplification with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP) in 2 Hours." 74: 64–74.

Zolfino, T et al. 2002. "Characteristics of Autoimmune Hepatitis in Patients Who Are Not of European Caucasoid Ethnic Origin." *Gut* 50(5): 713–17. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002145431>.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1- Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa- UFMG:



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.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9.2 Anexo 2- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido:

TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS

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.

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 é atendida e acompanhada 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 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 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 seu registro no hospital será revelado.

Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) 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 seu filho corre seriam os relacionados à coleta de exames para avaliação do laboratório, que são os mesmos quando se 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. 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 e seu nome só será conhecido pelos pesquisadores. O nome da criança 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 Druve Fagundes (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.

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:

Data:

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer com meu filho(a), 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 sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação do meu filho(a) no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

Assinatura do Pai, Mãe ou Responsável Data:

Assinatura da Criança de 7 a 12 anos 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.

Assinatura do Pesquisador Responsável Data:

TERMO DE ESCLARECIMENTO 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.

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 Druve Fagundes (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 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, o Sr(a) 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 seu filho corre seriam os relacionados a coleta de exames para avaliação do laboratório, que são os mesmo 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. 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 não será identificada 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 Druve Fagundes (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 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:

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.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data:

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:

Data:

A proposta e procedimentos deste projeto de pesquisa, assim como o desconforto previsível, riscos e benefícios que podem ocorrer com meu filho(a), 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 sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito. Eu fui informado que a participação do meu filho(a) no estudo poderá ser interrompida a qualquer momento. Eu recebi uma cópia deste Termo de Consentimento.

_____ Data:
Assinatura do Pai, Mãe ou Responsável

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