

Cynthia Koepfel Berenstein

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO
ALCOÓLICA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM
BIOPSIAS POR AGULHA E CONCORDÂNCIA
INTEROBSERVADOR**

Belo Horizonte, MG
Faculdade de Medicina da UFMG
2007

Cynthia Koepfel Berenstein

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO
ALCOÓLICA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA EM
BIOPSIAS POR AGULHA E CONCORDÂNCIA
INTEROBSERVADOR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Anatomia Patológica, para obtenção do título de Mestre em Anatomia Patológica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Hora Rios Leite

Belo Horizonte, MG
Faculdade de Medicina da UFMG
2007

Berenstein, Cynthia Koepel
B489d Doença hepática gordurosa não alcoólica: avaliação histopatológica em biópsias por agulha e concordância interobservador/Cynthia Koepel Berenstein. Belo Horizonte, 2007.
97f, il..
Dissertação.(mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.
Área de concentração: Patologia Médica
Orientadora: Virgínia Hora Rios Leite
1.Fígado gorduroso/patologia 2.Fígado gorduroso/diagnóstico
3.Fígado gorduroso/classificação 4.Biópsia por agulha 5.Inflamação/patologia 6. Reprodutibilidade dos testes 7.Variações dependentes do observador I.Título

NLM: WI 700
CDU: 616.36-03.826

Folha de Aprovação

AGRADECIMENTOS

À Professora Virgínia Hora Rios Leite, pela amizade, compreensão e orientação ao longo de mais de 5 anos. Ensinou-me a “namorar as lâminas” e me levou a descobrir o maravilhoso mundo da Anatomia Patológica.

Ao Dr. Nivaldo Hartung Toppa, pela pronta ajuda oferecida na elaboração desta dissertação.

Ao Guaxupé, Silvana e Dr. Roberto, pela compreensão e paciência com minhas ausências.

A todos os médicos que de alguma forma colaboraram na elaboração desta dissertação, especialmente ao Dr. Rogério Augusto Pinto da Silva.

Ao Júlio Alfredo Racchumi Romero, pelos auxílios estatísticos.

A Carolina pela ajuda.

Aos meus pais (Cláudio e Marli) e irmãs (Adriana e Cláudia), pela paciência, apoio e carinho.

E finalmente a Rafael, meu marido, pela paciência, amor e compreensão. Obrigado por estar ao meu lado!!!

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

Tabela 1: Correspondência entre doses e gramas de álcool. Fonte: alcoolismo.com.br	28
Tabela 2: Interpretação do teste Kappa ponderado	31
Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, parecer número ETIC 534/04 (vide anexo 3).....	31
Gráfico 1: Números absolutos da distribuição por sexo.	32
Tabela 3: Achados clínicos e laboratoriais disponíveis dentre os 70 casos estudados.....	34
Gráfico 3: Distribuição dos diagnósticos ultra-sonográficos de esteatose hepática.	35
Figura 1: Graduação da esteatose: A- Esteatose discreta (HE, 50X); B- Esteatose moderada (HE, 50X).	36
Figura 1B: Graduação da esteatose: Esteatose acentuada(HE, 50X).....	37
Figura 2: Esteatose microvacuolar em meio à esteatose macrovacuolar (HE, 400X).	37
Gráfico 4: Distribuição (%) da esteatose macrovacuolar.....	38
Tabela 4: Distribuição zonal da esteatose macrovacuolar, balonização e núcleos glicogenados.	39
Figura 3: Graduação da inflamação:	40
Figura 3B : Graduação da inflamação:	41
Gráfico 5: Distribuição (%) da atividade inflamatória lobular.	41
Figura 4: Lipogranuloma (HE, 400X).....	43
Figura 5- Núcleos glicogenados (setas).....	43
Figura 6: Hialinos de Mallory em hepatócitos balonizados.....	44
Figura 7: Presença de lipofusina ao redor da veia centrolobular (HE, 400X).	44
Gráfico 6: Distribuição (%) da fibrose.....	45
Figura 8: Estadiamento da fibrose:.....	46
Figura 8B : Estadiamento da fibrose.....	47
Tabela 5: Distribuição dos graus de esteatose macrovacuolar em relação aos graus da atividade inflamatória lobular.	48
Tabela 6: Distribuição dos graus de esteatose macrovacuolar em relação aos estágios da fibrose.	48
Tabela 7: Distribuição dos graus de atividade inflamatória lobular em relação aos estágios da fibrose.	49
Tabela 8: Valores de p para a relação entre as variáveis histológicas.	49
Tabela 9: Valores de p para o teste do X ² . Valor de p<0,0027	50
Tabela 10: Valores de p para a relação entre aminotransferases hepáticas e GGT e atividade inflamatória lobular.....	50
Tabela 11: Achados clínicos/laboratoriais de séries de pacientes com DHGNA. ...	52
Tabela 12: Relação AST/ALT e seus respectivos achados histológicos.....	54
Tabela 13: Comparação entre a deposição de ferro entre a amostra deste trabalho e Brunt et al (2004).	60

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
OBJETIVOS.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS	27
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	72
ARTIGO ENVIADO À REVISTA MODERN PATHOLOGY	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AASLD – American Association for the Study of Liver Disease

AG – Ácidos graxos

AGA – American Gastroenterology Association

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

DM/RI – Diabetes mellitus tipo 2/ resistência à insulina

EENA – Esteatoepatite não alcoólica

GGT – Gama glutamil transpeptidase

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HE – Hematoxilina- eosina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IMC – Índice de massa corporal

K_w – Coeficiente kappa ponderado

LDL –Lipoproteína de baixa densidade

MDA – Malondialdeído

NAFLD – Non alcoholic fatty liver disease

NASH – Non alcoholic steatohepatitis

NCEP - National Cholesterol Education Program

NF-KB – Fator nuclear KB

PAS – Ácido periódico-reativo de Schiff

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende espectro de lesões que vão desde a esteatose, esteatoepatite e cirrose até ao carcinoma hepatocelular, sendo a esteatoepatite não alcoólica (EENA) a forma progressiva da DHGNA. Suspeita-se de DHGNA se no exame clínico há hepatomegalia e/ou no ultra-som abdominal há acúmulo de lipídeos no fígado e/ou as aminotransferases são discreta (2 a 3 vezes o valor de referência) e persistentemente (duas ou mais ocasiões) elevadas em indivíduos sem qualquer causa que justifique estas alterações (exclusão de outras doenças hepáticas). Estes métodos propedêuticos apenas sugerem o diagnóstico. A biópsia hepática é padrão-ouro na avaliação da doença, sendo o único meio capaz de diferenciar EENA da esteatose como lesão única, graduar a inflamação e estadiar a fibrose. Neste trabalho analisam-se os achados histopatológicos de biópsias hepáticas e a concordância interobservador na avaliação histológica de casos com diagnóstico anátomo-patológico de esteatose ou esteatoepatite, com ou sem fibrose, sem menção de ingestão alcoólica na requisição do exame, valorizando-se os critérios mínimos para o diagnóstico de EENA. Setenta biópsias por agulha foram analisadas segundo Brunt et al (1999), com modificações. A forma discreta da EENA (grau 1) foi a mais comum e quando se detectou fibrose, o mais frequente foi o estágio 1. O componente determinante do grau da EENA foi a atividade inflamatória lobular. Existindo fibrose, intensidades crescentes de deposição de colágeno a partir da zona 3, com formação de septos, determinam o estágios 2 e 3. A concordância interobservador foi muito boa para esteatose macrovacuolar ($K_w=0,82$), boa para inflamação lobular ($K_w= 0,68$) e para fibrose ($K_w=0,73$). A classificação de Brunt et al (1999), com as modificações introduzidas, pode ser usada não apenas para a EENA mas também para a DHGNA e representa método confiável a ser usado na prática diária dos patologistas, além de prestar-se ao diagnóstico das formas brandas da EENA.

Palavras-chave: doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatoepatite não alcoólica, esteatose, fígado

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises a spectrum of lesions ranging from steatosis, steatohepatitis and cirrhosis to hepatocellular carcinoma, with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) being the progressive form of NAFLD. NAFLD is suspected in the case of hepatomegaly upon clinical examination, fat accumulation in the liver on abdominal ultrasound and/or discrete (2 to 3 times the reference value) and persistently elevated (two or more occasions) aminotransferase levels in individuals presenting no other cause of these alterations (exclusion of other liver diseases). However, these work-up methods only suggest the diagnosis. Liver biopsy is the gold standard for the diagnosis of the disease and is the only method able to differentiate NASH from simple steatosis, to grade inflammation and to stage fibrosis. In the present study, we analyzed the histopathological findings of liver biopsies and interobserver agreement in the histological evaluation of cases with an histological diagnosis of steatosis or steatohepatitis, with or without fibrosis and with no history of alcohol abuse in the exam request, with emphasis on the establishment of minimal criteria for the diagnosis of NASH. Seventy needle biopsies were analyzed according to Brunt et al (1999), with modifications. Discrete NASH (grade 1) was the most common form. If fibrosis was detected, stage 1 was the most frequent. Lobular inflammation determined NASH's grade. When fibrosis was present, increasing collagen deposition at zone 3, with septal formation, determined stages 2 and 3. Interobserver agreement was very good for macrovesicular steatosis ($K_w = 0.82$) and good for lobular inflammation ($K_w = 0.68$) and fibrosis ($K_w = 0.73$). The classification of Brunt et al (1999), with the modifications introduced here, can be applied to the diagnosis not only of NASH but also of NAFLD, representing a reliable method for use in the daily practice of pathologists, besides diagnosing mild forms of NASH.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, steatosis, liver.

INTRODUÇÃO

A partir de 1980, com a publicação de Ludwig e colaboradores, ao descreverem nova entidade clínico-patológica denominada esteatoepatite não alcoólica (EENA), este assunto compôs mais um capítulo em hepatologia. O perfil clínico de pacientes com esta recém nomeada entidade incluía, na maioria, mulheres obesas com diabetes mellitus tipo 2 e/ou dislipidemia. Na história pregressa, persistentemente, havia referência à ausência ou consumo mínimo de bebida alcoólica. Por mais de uma década, muitas pesquisas reforçaram estes achados, firmando a existência da entidade EENA cujo aspecto histológico, embora semelhante ao da esteatoepatite alcoólica, clinicamente, não se relacionava à ingestão de álcool. Nesse período, ficou também evidente a evolução de esteatose para EENA e desta para cirrose. Assim, foi proposta a denominação de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) para definir o espectro de lesões relacionadas à esteatose, na ausência de ingestão alcoólica ou referente a consumo mínimo de etanol, definido como de até 20g/dia.

A obesidade, a resistência à insulina ou diabetes tipo 2 e as dislipidemias são fatores de risco para a DHGNA. Até hoje sua real prevalência não é conhecida, pois os estudos geralmente se baseiam em uma população com obesidade mórbida ou diabetes, nos quais a incidência da doença é elevada. Entre os obesos 70 a 80% têm DHGNA e 20% destes têm EENA. Entre os diabéticos tipo 2, 75% têm alguma forma de DHGNA. Outras condições estão associadas ao desenvolvimento da DHGNA, sendo elas: ressecção intestinal, bypass jejuno-ileal, nutrição parenteral total e uso de alguns medicamentos como amiodarona, diltiazem e tamoxifeno.

Na atualidade tem sido mostrado que a DHGNA é provavelmente a lesão hepática mais prevalente dos Estados Unidos, atingindo de 20 a 30% da população geral. Estima-se que 10% destes indivíduos, ou seja, 2 a 3 % da população geral, sejam portadores de EENA. O aumento de incidência da obesidade na população, calculada como crescente ano a ano, e acometendo não apenas adultos, mas também crianças, já é problema de saúde pública. Estima-se

que cerca de 40% da população dos Estados Unidos será obesa em 2008 e já se constata taxas de prevalência de obesidade e diabetes tipo 2 na infância. Além disso, casos de DHGNA têm sido relatados em pacientes que clinicamente não apresentam fatores de risco para a doença.

Suspeita-se de DHGNA quando o exame clínico e o ultra-som abdominal demonstram hepatomegalia e este último sugere acúmulo de lipídeos no fígado e/ou quando as aminotransferases estão discreta (duas a três vezes o valor de referência) e persistentemente (em duas ou mais ocasiões) elevadas em indivíduos sem qualquer causa que justifique estas alterações (exclusão de outras doenças hepáticas). Estes métodos propedêuticos são em geral insuficientes para o diagnóstico. Achados sugestivos de esteatose ao ultra-som não permitem diferenciar entre a esteatose simples e a esteatoepatite. A DHGNA pode também ocorrer em pacientes com níveis normais de aminotransferases. O exame da biópsia hepática por punção percutânea é pois considerado de padrão-ouro para avaliação.

As lesões histopatológicas que caracterizam a EENA são: esteatose predominantemente macrovacuolar, balonização hepatocitária, focos de atividade inflamatória lobular com linfócitos e neutrófilos, podendo ou não haver intensidades variáveis de fibrose. A biópsia hepática é de valor diagnóstico inquestionável na DHGNA, sendo o exame que melhor informa sobre as lesões existentes e com as quais se pode estabelecer correlação anátomo-clínica. Apesar disso, há variabilidade amostral caso duas biópsias simultâneas sejam efetuadas no mesmo paciente.

Mesmo sendo o exame da biópsia hepática de grande valor, dúvidas ainda persistem sobre: que alterações histopatológicas melhor definem as formas clínicas de evolução branda; qual a relação entre o grau de esteatose, a atividade inflamatória e a fibrose; que critérios são suficientes e necessários para se diagnosticar esteatoepatite discreta. Além disso, é necessário também ter noção sobre a interferência da variação interobservador na definição diagnóstica; há poucos estudos sobre esta variabilidade na avaliação histológica, tendo havido, dentre as pesquisas realizadas, maior concordância na graduação da esteatose e

no estadiamento da fibrose. Com relação à atividade inflamatória houve baixa concordância entre os examinadores.

Estudos prospectivos de indivíduos com DHGNA têm demonstrado o desenvolvimento de formas mais graves da doença com o passar do tempo. Um terço dos pacientes com EENA sustentada evoluem com fibrose. A cirrose hepática é complicação conhecida que ocorre em 7 a 20% dos indivíduos portadores de EENA. A EENA tem sido relatada em estudos retrospectivos como responsável por casos de cirrose criptogênica. Já existem também relatos da ocorrência de carcinoma hepatocelular em pacientes portadores de EENA. Todas estas possibilidades evolutivas justificam a necessidade de se fazer diagnóstico precoce da EENA, assim como de se caracterizar possíveis lesões preditivas de mau prognóstico, o que poderia modificar a história natural da doença.

Esta pesquisa visa descrever detalhadamente a histologia da biópsia hepática de pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de esteatose ou esteatoepatite, com ou sem fibrose, sem menção de ingestão alcoólica na requisição do exame, com ênfase na identificação das lesões e na utilização de critérios mínimos para o diagnóstico de EENA, tendo como base a classificação de Brunt et al (1999) e Brunt (2004). Com isto, espera-se obter boa concordância interobservador, possibilitando uma classificação segura da DHGNA na prática diária do patologista. Adicionalmente, far-se-ão testes estatísticos para tentar estabelecer relações anátomo-patológicas e clínicas que reforçam o diagnóstico da doença.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Considerações iniciais

A história da EENA teve início em 1980 com a publicação de Ludwig e colaboradores. Eles descreveram 20 casos de esteatoepatite morfológicamente indistinguíveis da esteatoepatite alcoólica em pacientes que negavam o uso de álcool. Predominavam na amostra mulheres obesas, com idade média de 54 anos.

Trabalhos subseqüentes reforçaram os achados de Ludwig et al (1980) firmando a existência da entidade denominada EENA, cujo aspecto histológico, embora semelhante ao da esteatoepatite alcoólica, clinicamente, não se relacionava à ingestão de álcool. Com o passar do tempo foi ficando também evidente que o acometimento hepático nos pacientes não se expressava exclusivamente como EENA, mas poderia ocorrer como esteatose (lesão única), com ou sem fibrose ou cirrose (Bacon et al, 1994; Brunt et al, 1999; Brunt 2004). As pesquisas também demonstraram a possibilidade de evolução da esteatose para EENA, e daí, para fibrose, em graus variáveis, podendo culminar com cirrose hepática, forma grave e irreversível da doença (Bugianesi et al, 2002; Hübscher, 2006). Assim, foi proposta a denominação de DHGNA para definir o espectro de lesões hepáticas relacionadas à esteatose, na ausência de ingestão alcoólica ou referente a consumo mínimo de etanol, definido como de até 20g/dia (Bacon et al, 1994).

Epidemiologia

A real prevalência da DHGNA não é conhecida, pois os estudos geralmente se baseiam em populações selecionadas de pacientes com obesidade mórbida ou diabetes tipo 2, nos quais a incidência da doença é elevada (Contos & Sanyal, 2002). Ela ocorre em todas as idades, inclusive em crianças. Estima-se que na população geral norte-americana sua prevalência seja de 20 a 30 % e que a de EENA seja de 2 a 3 %, tornando a DHGNA a doença hepática potencialmente

mais comum nos Estados Unidos (Younossi et al, 2002; Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003). As crianças parecem ser afetadas em 2.6% dos casos (Tominaga et al, 1995) e se forem obesas a prevalência de DHGNA pode variar de 22,5 (Tominaga et al, 1995) a 53% (Franzese et al, 1997) quando examinadas com ultra-som. Acredita-se que a prevalência da DHGNA tende a aumentar juntamente com o aumento das taxas de obesidade, inclusive nas crianças, constituindo problema de saúde pública. Estima-se que cerca de 40% da população dos Estados Unidos será obesa em 2008 (Hill et al, 2003).

Casos de EENA também têm sido relatados em pacientes que clinicamente não apresentam os fatores de risco para desenvolverem a doença, ou seja, são homens, não obesos, não diabéticos e não portadores de hiperlipidemia (Bacon et al, 1994; Marchesini et al, 2001; Contos & Sanyal, 2002).

A obesidade, a resistência à insulina ou diabetes tipo 2 e as dislipidemias são os principais fatores de risco para a DHGNA (Clark et al, 2002; Kang et al, 2006). Dentre estes a obesidade é a condição mais frequentemente associada à DHGNA: Neuschwander & Caldwell (2003) relatam que 60% dos pacientes obesos têm DHGNA e que a EENA é encontrada em 20 a 25% deles. Contos & Sanyal (2002) citam que 80% dos pacientes com obesidade mórbida [aqueles com índice de massa corporal (IMC) > 35] têm DHGNA e 20% destes têm EENA. Vale lembrar que pacientes não obesos também podem ser acometidos, porém em menor proporção. Entre os diabéticos tipo 2 obesos, 48,4% têm EENA (Silverman et al, 1990). Por estar tão comumente ligada a condições que caracterizam a Síndrome metabólica, a DHGNA tem sido considerada a sua manifestação hepática (Brunt, 2004; Kang et al, 2006). Outras condições estão associadas ao desenvolvimento da DHGNA, sendo elas: ressecção intestinal, *bypass* jejuno-ileal, nutrição parenteral total e uso de alguns medicamentos como amiodarona, diltiazem e tamoxifeno (Contos & Sanyal, 2002).

Patogênese

A insulina tem efeitos importantes no metabolismo dos carboidratos e

lipídeos, mediando e sendo essencial para o desenvolvimento da esteatose hepática e da esteatoepatite. Em condições fisiológicas a insulina promove a lipogênese periférica e a síntese de glicogênio, inibe a gliconeogênese e diminui a oxidação lipídica. A resistência à insulina está associada ao aumento da disponibilidade de ácidos graxos (AG) livres para o fígado, aumento da β -oxidação mitocondrial e aumento da síntese de triglicerídeos a partir desses AG livres. Os triglicerídeos podem se acumular no fígado devido ao aumento da disponibilidade de AG livres ou à diminuição na produção e/ou secreção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (Contos & Sanyal, 2002). Os triglicerídeos acumulados no citoplasma constituem vacúolo [identificado à hematoxilina-eosina (HE)] que rechaça o núcleo para a periferia (esteatose macrovacuolar). Se há oxidação dos AG há formação de radicais livres, peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio. (McCullough, 2002).

A peroxidação lipídica parece ligar a esteatose à atividade inflamatória. Dois dos aldeídos produzidos na peroxidação são os principais mediadores: o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (McCullough, 2002). O MDA ativa o NF- κ B (fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão), promovendo a produção do fator de necrose tumoral alfa, interleucina 8 e selectina E. O 4-hidroxinonenal ativa as células estreladas do fígado, promovendo a deposição de colágeno e conseqüente fibrose. Ele também está implicado na formação dos corpúsculos hialinos de Mallory e na quimiotaxia dos neutrófilos (Day & James, 1998).

A partir dessas informações Day & James (1998) propuseram o modelo dos dois *hits*, o qual tenta explicar por que alguns pacientes permanecem indefinidamente apenas com esteatose e outros evoluem com esteatoepatite e fibrose. Segundo eles, em adição à esteatose (primeiro *hit*), o desenvolvimento da esteatoepatite requer um segundo *hit* referente à maior produção ou incapacidade de inativação dos radicais livres produzidos na β -oxidação, com persistência da sua ação lesiva na célula (estresse oxidativo).

Wanless e Shiota propuseram em 2004 um modelo para a patogênese da EENA constituído por quatro etapas. As duas primeiras consistem nos dois *hits*

propostos por Day & James (1998). A terceira etapa seria o extravasamento dos lipídeos no interstício hepático levando ao dano direto e à inflamação das veias hepáticas. A quarta e última etapa consistiria na obstrução venosa com colapso secundário, fibrose e finalmente cirrose.

Quadro clínico

A maioria dos pacientes (77%) é assintomática (Lee, 1989; Matteoni et al, 1999; Contos & Sanyal, 2002; Zafrani, 2004). Eles geralmente procuram o atendimento médico por outros motivos e acabam descobrindo enzimas hepáticas pouco elevadas e/ou hepatomegalia. Fadiga e mal-estar podem ser atribuídos à doença hepática (Bacon et al, 1994). Dor no quadrante superior direito descrita como vaga e inespecífica também pode ocorrer. Uma fração menor dos pacientes experimenta prurido, anorexia e náuseas, indicando doença mais grave. Ascite, anasarca, varizes esofagianas e encefalopatia hepática ocorrem apenas quando há cirrose descompensada (Contos & Sanyal, 2002).

A hepatomegalia está presente em até 50% dos pacientes (Contos & Sanyal, 2002). Sua presença pode chegar a até 95% quando as dimensões hepáticas são avaliadas por ultra-som (Powell et al, 1990). Ao exame ultra-sonográfico, a esteatose hepática produz aumento difuso da ecogenicidade quando comparada com a dos rins. A ultra-sonografia tem sensibilidade de 89% e especificidade de 93% na detecção de esteatose e sensibilidade e especificidade de 77 e 89%, respectivamente, para o diagnóstico de fibrose (Joseph et al, 1991).

A alteração laboratorial mais comum é o aumento de duas a quatro vezes das aminotransferases hepáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (Bacon et al, 1994; Teli et al, 1995). Cinquenta a 90% dos pacientes hospitalares mostram aminotransferases elevadas, sendo o valor de ALT normalmente mais alto que o de AST (Bacon et al, 1994; Contos & Sanyal, 2002). A relação AST/ALT é geralmente menor que um na DHGNA, o que ajuda a distingui-la da doença hepática alcoólica (Diehl et al, 1998; Matteoni et al, 1999). Relação maior que um na DHGNA sugere estágio avançado da doença (Matteoni

et al, 1999; Angulo et al, 1999). Vale ressaltar que todo o espectro histológico da DHGNA pode ocorrer em indivíduos com valores normais de ALT e um valor normal não garante que o indivíduo não tenha um quadro de fibrose avançada (Mofrad et al, 2003). No estudo de Sorrentino et al (2004), de um total de 80 pacientes com Síndrome metabólica e enzimas hepáticas normais, 72,5% apresentavam quadro histológico compatível com EENA. Destes, 10% apresentavam cirrose. A gama glutamil transpeptidase (GGT) pode estar aumentada em duas ou três vezes em 50% dos pacientes. Bilirrubina e albumina são geralmente normais, a não ser que a doença tenha avançado para cirrose (Contos & Sanyal, 2002; Adams & Talwalkar, 2006).

Atualmente não existem métodos não invasivos capazes de estabelecer o diagnóstico de EENA (Sanyal, 2002). A intensidade da elevação das aminotransferases não é específica e não é capaz de diferenciar entre esteatose e esteatoepatite (Lee, 1989). O mesmo acontece com os métodos de imagem (Sanyal, 2002). A biopsia hepática é, portanto, o melhor método diagnóstico para confirmar a DHGNA, verificar a existência de inflamação e fibrose e fornecer informações prognósticas, além de poder ser usada para avaliar os efeitos de tratamento. Ela é considerada o exame de padrão-ouro, devendo o diagnóstico da doença ser efetivado através da correlação anátomo-clínica (Younossi et al, 2002, Adams & Talwalkar, 2006).

Quadro histológico

As lesões histopatológicas necessariamente presentes para o diagnóstico de EENA são: a esteatose predominantemente macrovacuolar, a balonização hepatocitária e os focos de infiltrado inflamatório misto com mono e polimorfonucleares neutrófilos (Bacon et al, 1994; Brunt, 2001; Brunt 2004). Os critérios mínimos, no entanto, até hoje ainda não são bem definidos. Concorda-se que o diagnóstico histopatológico de EENA baseia-se em uma série de características e não apenas em uma delas. Nenhum achado isolado na microscopia é suficiente para o diagnóstico de esteatoepatite (Brunt, 2001). A

necessidade da presença de fibrose para o diagnóstico da EENA é ainda uma área de discussão. Em 2004 Brunt pesquisou quais critérios eram usados para avaliar a EENA através de formulário eletrônico. Dez hepatopatologistas internacionais opinaram sobre as lesões histopatológicas e as dividiram nas seguintes categorias: necessárias; comuns mas não necessárias ou suficientes; ajudam mas não são suficientes ou necessárias; incomuns mas podem ocorrer e pouco usuais. Embora a fibrose tenha sido considerada comum e achado histológico que ajuda no diagnóstico, 80% dos respondentes não necessitam da presença de fibrose para fazer o diagnóstico de EENA. Segundo esta autora, alargar os critérios de EENA para incluir qualquer quadro de inflamação e esteatose significa inclusão inapropriada de pacientes que não têm um quadro verdadeiro de esteatoepatite. Entretanto, adotar critérios muito rígidos significa aceitar como EENA somente aqueles casos mais graves e excluir pacientes com doença branda que poderiam se beneficiar de algum tratamento (Brunt, 2001).

A esteatose é a única variável histológica presente em 100% dos casos. Predomina a forma macrovacuolar, aquela caracterizada pela presença de grande vacúolo de gordura que empurra o núcleo para a periferia. Em muitos casos, geralmente os mais graves (Brunt, 2001), há também esteatose microvacuolar, formada por numerosos pequenos vacúolos citoplasmáticos que provocam indentações no núcleo centralmente localizado. Ambos os tipos de esteatose são facilmente reconhecidos à microscopia óptica, não sendo necessário o uso de colorações especiais. Na DHGNA a esteatose acomete primeiramente a zona 3 do ácino, poupando a zona 1. Ela pode também ser panacinar. Em casos em que há evolução para cirrose, a esteatose pode diminuir e até mesmo desaparecer (Bugianesi et al, 2002; Liou & Kowdley, 2006). A maioria dos estudos gradua de forma semiquantitativa a esteatose macrovacuolar: ela é classificada como discreta quando compromete de 0 a 33% dos hepatócitos; moderada quando compromete 33 a 66% e acentuada quando compromete mais de 66% dos hepatócitos (Brunt, 2001; Brunt 2004).

A balonização, alteração morfológica que denota dano celular, é consequência da disfunção de microtúbulos e da diminuição de secreção de

proteínas, acompanhada de retenção de fluido dentro do hepatócito (Burt et al, 1998). O citoplasma dos hepatócitos baloniformes adquire aspecto finamente granular e eles se tornam arredondados, edemaciados. Geralmente estão presentes nas áreas com esteatose, ou seja, na região perivenular (zona 3) (Brunt, 2001; Brunt 2004).

As células baloniformes podem conter hialinos de Mallory. Eles são inclusões homogêneas, eosinofílicas e perinucleares, podendo ser vistos em colorações de rotina. Eles são formados por proteínas do citoesqueleto agregadas, podendo também ser detectadas por imuno-histoquímica (são positivos para citoqueratinas 7, 18 e 19 e ubiquitina) (Burt et al, 1998). A natureza quimiotática dos hialinos de Mallory promove o acúmulo de neutrófilos ao redor do hepatócito que o contem, fenômeno chamado de satelitose. Eles tendem a ser menos freqüentes que na hepatite alcoólica (Ludwig, 1980; Burt et al, 1998; Diehl, et al, 1998) e nem sempre são bem formados (Burt et al, 1998).

A inflamação da EENA é tipicamente discreta e lobular. O infiltrado inflamatório portal pode ser discreto e composto por mononucleares. Inflamação portal intensa com atividade de interface sugere outra etiologia, como hepatite crônica viral, auto-imune ou induzida por drogas. Os infiltrados lobulares se caracterizam por um misto de mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos (Brunt, 2001). A atividade inflamatória na EENA é geralmente mais discreta que na hepatite alcoólica (Diehl et al, 1988). Lipogranulomas podem também estar presentes, embora não sejam diagnósticos de EENA. Eles nada mais são do que uma reação gigante-celular tipo corpo estranho a hepatócitos repletos de lipídeos que se romperam (Burt et al, 1998). São formados por células mononucleares e células de Kupffer, com eosinófilos ocasionais (Brunt, 2001).

Corpos acidofílicos densamente eosinofílicos resultam de hepatócitos apoptóticos. Eles são detectados não apenas na EENA, mas também em casos de hepatite alcoólica e esteatose simples (Brunt, 2001; Brunt 2004).

A presença de núcleos vacuolizados, repletos de glicogênio, é comum mas não diagnóstica de EENA (Brunt, 2001). Eles são vistos em 70 a 80% dos casos

de DHGNA e em apenas 5 a 10% dos casos de hepatite alcoólica (Hübscher, 2004).

Mitocôndrias aumentadas de tamanho, conhecidas como megamitocôndrias, podem ocorrer na EENA. Aparecem como inclusões citoplasmáticas arredondadas ou em forma de agulha (Brunt, 2001).

O pigmento férrico detectado pela coloração de Perls nos hepatócitos é pouco usual e quando presente ocorre em pequena quantidade (tipicamente graduado como 1+ ou 2+) (Brunt, 2004). George et al (1998) demonstraram que a maioria dos pacientes com EENA e pigmento férrico nos hepatócitos detectado pela coloração de Perls tem um ou dois alelos com a mutação Cys282Tyr (mutação da hemocromatose hereditária).

O padrão da fibrose é uma das características da EENA. A deposição de colágeno é observada primeiramente na região perivenular/perisinusoidal da zona 3, juntamente com as outras lesões da EENA. O colágeno pode envolver células isoladamente, em um padrão conhecido como fibrose pericelular ou em “cerca de galinheiro” (do inglês *chicken wire*). Esse padrão de fibrose distingue as esteatoepatites alcoólica e não alcoólica de outras formas de doenças crônicas do fígado que têm como base fibrose portal. Com a progressão do dano, há fibrose portal, formação de septos que acabam por ligar veias centrolobulares e espaços portas entre si e finalmente estabelecimento da cirrose (Brunt, 2001). Quando densa a fibrose pode ser observada na coloração pela hematoxilina e eosina (HE), mas em todos os casos é imediatamente detectada por colorações histoquímicas para colágeno, como por exemplo, o tricrômico de Masson. A reticulina de Sweet e o picrosirius evidenciam mais tipos de colágeno que o tricrômico de Masson. O uso dessas colorações pode resultar na observação de mais fibrose que a detectada pelo tricrômico de Masson (Brunt, 2004).

Classificações

Em 1999 o grupo de Cleveland (Matteoni et al, 1999) adotou um sistema para categorizar as lesões da DHGNA. Eles dividiram as lesões em quatro grupos:

Grupo 1: esteatose hepática apenas.

Grupo 2: esteatose hepática + inflamação.

Grupo 3: esteatose hepática + balonização.

Grupo 4: grupo 3 + hialinos de Mallory ou fibrose.

Neste estudo, 37% dos casos pertenciam ao grupo 1, 8% ao grupo 2, 14% ao grupo 3 e 41% ao grupo 4. Falck-Ytter et al (2001), Cotrim et al (2004) e Siqueira et al (2005), consideraram apenas os grupos 3 e 4 como EENA em seus trabalhos.

Ainda em 1999 Brunt et al propuseram um método semi-quantitativo para graduar a atividade inflamatória e estadiar a fibrose na EENA. A classificação segue abaixo:

Grau 1 (EENA discreta): esteatose (predominantemente macrovacuolar) comprometendo até 66% dos hepatócitos. Balonização ocasional na zona 3. Focos esparsos de infiltrado inflamatório de polimorfonucleares intralobulares. Inflamação portal ausente ou discreta.

Grau 2 (EENA moderada): esteatose de qualquer grau. Balonização óbvia de hepatócitos na zona 3. Infiltrado inflamatório de polimorfonucleares mais importante que em 1, podendo estar associado a fibrose pericelular na zona 3. Inflamação portal discreta a moderada.

Grau 3 (EENA acentuada): esteatose panacinar (tipicamente > 66%). Balonização acentuada na zona 3. Inflamação lobular mais acentuada que em 2. Inflamação portal discreta a moderada.

O estadiamento da fibrose proposto por Brunt et al (1999) foi:

Estágio 1: fibrose perisinusoidal/pericelular na zona 3, focal ou extensa.

Estágio 2: estágio 1 + fibrose periportal focal ou extensa.

Estágio 3: estágio 2 + fibrose em ponte focal ou extensa.

Estágio 4: cirrose.

Apesar de todo esse detalhamento a respeito da classificação existem críticas quanto ao valor da biópsia por agulha para avaliação de doenças crônicas do fígado. Franzén et al (2005) afirmam que a avaliação semi-quantitativa da esteatose superestima o seu grau, quando em comparação com a técnica de

contagem de pontos. Além disso, questiona-se se a biópsia por agulha, a qual representa cerca de 1/50.000 do fígado (Lee, 1994), seria representativa da totalidade do envolvimento hepático. Ratziu et al (2005) demonstraram que há variabilidade amostral caso duas biópsias simultâneas (com diferenças quanto à angulação da agulha) sejam efetuadas no mesmo paciente. Em 24% dos casos a balonização não teria sido identificada e em 35% dos pacientes a fibrose teria sido sub-estadiada.

Correlações

As correlações clinico-patológicas já descritas são as mais variáveis. Marceau et al (1999) demonstraram que a hipertensão arterial sistêmica (HAS), a resistência à insulina e a dislipidemia correlacionaram-se estatisticamente com os graus de esteatose e fibrose. Eles relatam também que o diabetes mellitus correlacionou-se com a fibrose. Brunt et al (2004) não encontraram correlação entre esteatose e sexo, peso, IMC, AST, ALT, GGT, níveis de triglicerídeos e colesterol; fibrose também não se correlacionou com diabetes. Silverman et al (1990) relataram que graus crescentes de esteatose e fibrose correlacionaram-se com glicemia aumentada em 100 pacientes com obesidade mórbida.

Segundo Marchesini et al (2001), os níveis de ALT não se correlacionaram com a esteatose ou fibrose, mas houve associação entre ALT e a atividade inflamatória. Brunt et al (2004) e Lee (1989) não encontraram tal associação.

Entre as três principais variáveis histológicas os achados também são discordantes. Angulo et al (1999) e Brunt et al (2004) não encontraram relação estatisticamente significativa entre o grau de esteatose, o *score* de fibrose e o grau de inflamação. Marchesini et al (2001) não identificaram associação entre esteatose e inflamação, assim como Marceau et al (1999), o qual mostrou relação entre fibrose e esteatose. Já Ratziu et al (2000) encontraram forte associação entre a fibrose septal e a atividade inflamatória.

Concordância interobservador

Raros são os trabalhos que estudaram a variação inter e intraobservador na análise da DHGNA. Younossi et al (1998) utilizaram o mesmo sistema de Matteoni et al (1999) e calcularam a variação inter e intraobservador. Concordância moderada (0,41-0,60) entre os observadores foi encontrada para o grau de esteatose, localização da esteatose, grau de fibrose, balonização e núcleos glicogenados. A concordância intraobservador foi mais alta que a interobservador. A inflamação não teve boa concordância entre os patologistas, como já foi observado para outras doenças hepáticas. Mendler et al (2005), ao proporem um sistema de classificação para a DHGNA, também encontraram concordância intraobservador melhor do que a interobservador, indicando que os patologistas concordam mais consigo mesmos do que uns com os outros. A concordância interobservador foi boa para a fibrose perisinusoidal e moderada a boa para esteatose. Novamente para a inflamação a concordância foi mais baixa. Apenas um trabalho para avaliação da concordância interobservador (Kleiner et al, 2005) utilizou a classificação de Brunt et al (1999).

Evolução

A DHGNA é doença lentamente progressiva, com potencial de evolução para cirrose (Powell et al, 1990; Falck-Ytter et al, 2001; Bugianesi et al, 2002; Fasio et al, 2004). Pacientes com esteatose hepática parecem ter curso extremamente benigno (Matteoni et al, 1999; Teli et al 1995). Teli et al (1995) observaram que, em 12 pacientes, seguidos por 7,6 a 16 anos, não houve alteração do quadro histológico na segunda biópsia, inclusive da intensidade da esteatose. Apenas uma paciente que mostrava esteatose acentuada desenvolveu moderada fibrose pericelular e discreta fibrose peri-venular. Bacon et al (1994) estudaram 33 biópsias de pacientes com diagnóstico anátomo-clínico de EENA e observaram que 18% deles apresentavam fibrose em ponte e 15% já mostravam cirrose. Lee (1989), acompanhou 39 pacientes por 3,8 anos em média. Destes

indivíduos, 13 (seguidos por 3,5 anos em média) apresentaram uma segunda biópsia e oito (61,5%) não mostraram diferenças na histologia, mantendo-se o quadro estável. Cinco (38,5%) pacientes mostraram progressão da fibrose, sendo que dois (15,3%) deles evoluíram para cirrose. Angulo (2002) reuniu dados de cinco séries (Lee, 1989; Powell et al, 1990; Bacon et al, 1994; Teli et al, 1995 e Ratziu et al, 2000), totalizando 54 pacientes com seguimento médio de 3,5 a 11 anos. Destes, 28% apresentaram progressão do dano hepático, 59% não sofreram alterações e 13% apresentaram melhora histológica.

Tem sido proposto que a EENA seja uma possível causa da chamada cirrose criptogênica. Embora algumas das características histológicas da EENA desapareçam com a progressão da doença para cirrose (como por exemplo, a esteatose), a prevalência de fatores de risco para DHGNA está aumentada em pacientes com cirrose criptogênica (Zen et al, 2001; Bugianesi et al, 2002; Yoshioka et al, 2004). Há também relatos de carcinoma hepatocelular em pacientes que possuíam biópsia prévia com diagnóstico de EENA (Zen et al, 2001; Yoshioka et al, 2004), sendo essa neoplasia uma complicação possível da DHGNA. Shimada et al (2002) acompanharam 82 pacientes com EENA durante 11 anos. Dezesesseis pacientes (19,5%) desenvolveram cirrose e seis (7,3% do total) evoluíram com carcinoma hepatocelular. Em todos os casos o tumor estava presente em fígados cirróticos e a cirrose por si só pode atuar como promotora da transformação neoplásica. Esses autores consideraram o carcinoma hepatocelular uma complicação freqüente o suficiente para que se faça o rastreamento dos pacientes em risco. Outro estudo (Hui et al, 2003) seguiu 23 pacientes com EENA durante 7 anos em média e nenhum dos pacientes evoluiu com carcinoma hepatocelular.

Angulo et al (1999) identificaram fatores de risco para fibrose. A chance de se encontrar fibrose na biópsia aumenta quando o paciente tem mais de 45 anos, quando a relação AST/ALT é maior que um e quando ele é portador de obesidade ou diabetes. Outros estudos criaram *scores* que tentam prever aqueles indivíduos portadores de algum grau de fibrose. Ratziu et al (2000) criaram o *score* BAAT que se baseia em quatro variáveis independentes identificadas através de análise

multivariada. São elas: IMC (do inglês BMI – body mass index: se $\geq 28 = 1$; $< 28 = 0$), idade (Age: $\geq 50 = 1$; $< 50 = 0$), ALT [$\geq 2N$ (normal) = 1; $< 2N = 0$] e Triglicérides séricos ($\geq 1,7\text{mmol/l} = 1$; $< 1,7\text{mmol/l} = 0$). Quanto maior o resultado, maior a chance de existir fibrose. Dixon et al (2001), no entanto, ao utilizarem o BAAT, observaram poder preditivo fraco em relação à fibrose, o que indica que a seleção da amostra pode alterar quais fatores preditivos estão associados às variáveis histológicas. Seus resultados indicaram como fatores preditivos da existência de fibrose a hipertensão arterial (se presente = 1), dosagem de ALT (se $> 40\text{UI} = 1$) e o índice de resistência à insulina (*insulin resistance*), criando assim o score HAIR.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Descrever detalhadamente a histologia da biópsia hepática de pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de esteatose ou esteatoepatite, com ou sem fibrose, com ênfase na identificação das lesões e na utilização de critérios mínimos para o diagnóstico de EENA, tendo como base a classificação de Brunt et al (1999) e Brunt (2004). Com isto, espera-se obter boa concordância interobservador, possibilitando uma classificação segura da DHGNA na prática diária do patologista. Adicionalmente, far-se-ão testes estatísticos para tentar estabelecer relações anátomo-patológicas e clínicas que reforçam o diagnóstico da doença.

Objetivos específicos:

- Graduar a esteatose hepática e a atividade inflamatória lobular e estadiar a fibrose das biópsias selecionadas;
- Relacionar estatisticamente esteatose, atividade inflamatória lobular e fibrose;
- Calcular a concordância interobservador para as variáveis esteatose, atividade inflamatória lobular e fibrose;
- Estabelecer relações anátomo-clínicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi retrospectiva. Foram avaliadas biópsias hepáticas por agulha encaminhadas ao Laboratório Análys de Anatomia Patológica no período de 1999 a 2006 com diagnóstico anátomo-patológico de esteatose hepática ou esteatoepatite de qualquer grau, com ou sem fibrose. A seleção considerou casos em cujo pedido de exame não havia menção ao uso abusivo de álcool (definido como consumo maior que 20 g/dia) nem à sorologia positiva para os vírus B e/ou C e ao uso de medicamentos hepatotóxicos. Clinicamente tais pacientes apresentavam elevações nas aminotransferases hepáticas e/ou alterações na ultra-sonografia abdominal, justificando assim a realização da biópsia hepática. Foram identificados com essas características 200 casos.

Após consulta detalhada do prontuário de cada indivíduo, foram excluídos 89 casos pelos seguintes motivos: a amostra pertencia a fígado transplantado [n total=10, sendo as causas primárias dos transplantes as seguintes: hepatite auto-imune (n=1), cirrose biliar secundária (n=1), etilismo (n=1), etilismo e vírus não especificado (n=1) e hepatopatia pelo vírus C (n=6)], paciente heterozigoto para hemocromatose (n=5), paciente etilista (n=35), presença de auto-anticorpos (n=4), paciente portador de vírus B (n=5), paciente portador do vírus C (n=5), paciente etilista e portador do vírus C (n=2), paciente portador de hepatite por antiinflamatórios não esteroidais (n=1), casos de revisão cujos blocos e lâminas não estavam disponíveis (n=3), pacientes cujo prontuário não foi encontrado (n=7) e impossibilidade de contactar o médico responsável (n=12).

Com relação ao etilismo foi utilizada a tabela 1 para conversão das informações dos prontuários médicos para gramas de álcool. Indivíduos taxados como etilistas sociais foram incluídos no estudo.

Conteúdo das principais bebidas em nosso meio		
Bebidas	Concentração de álcool / gramas de álcool	Unidades de álcool
1 lata de cerveja - 350 ml	5% = 17 gramas de álcool	1,5
1 dose de aguardente - 50 ml	50% = 25 gramas de álcool	2,5
1 copo de chope - 200 ml	5% = 10 gramas de álcool	1
1 copo de vinho – 90 ml	12% = 10 gramas de álcool	1
1 garrafa de vinho - 750 ml	12% = 80 gramas de álcool	8
1 dose de destilados (uísque, pinga, vodca etc.) - 50 ml	40%-50% = 20g - 25g de álcool	2-2,5
1 garrafa de destilados - 750 ml	40% - 50% = 300g-370 gramas de álcool	30-37

Tabela 1: Correspondência entre doses e gramas de álcool. Fonte: alcoolismo.com.br

Para que a biópsia por agulha fosse considerada representativa ela deveria conter pelo menos cinco tratos portais (Crawford et al, 1998). Já que todas as lesões fundamentais acometem preferencialmente a zona 3, também foram consideradas como representativas as biópsias que continham também pelo menos cinco veias centrolobulares. A presença de esteatose foi condição *si ne qua non* para inclusão e casos com menos de 5% de hepatócitos esteatóticos foram considerados normais (Brunt et al, 2004) e excluídos do estudo. Com base nesses critérios foram excluídos mais 40 casos: biópsia em cunha (n=4), menos de cinco tratos portais (n=7), menos de cinco veias centrolobulares (n=21), fígado normal (n=8). Foi ainda desconsiderada uma biópsia com colestase acentuada e hemácias falcizadas.

As 70 amostras restantes já haviam sido processadas de maneira rotineira no serviço de origem, ou seja, foram fixadas em formol a 10%, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol, clareadas em xilol e infiltradas/emblocadas em parafina. A microtomia e coloração dos cortes em lâminas, pelas técnicas de HE e tricrômico de Masson ou Gomori já haviam sido

feitas no laboratório primário. A partir dos blocos foram feitos novos cortes corados pelas técnicas de Perls e picrosírius. Eventualmente, se necessário, foram feitos novos cortes que foram corados em HE ou tricrômico de Masson.

As lâminas coradas em HE e tricrômico de Masson/Gomori foram examinadas por dois patologistas experientes, sem conhecimento dos informes clínicos/laboratoriais. Para a análise foi utilizado protocolo próprio (vide anexo 1) baseado nos parâmetros de Brunt et al (1999) e Brunt (2004), com algumas modificações. No estudo as biópsias foram medidas no seu maior eixo, somando-se o valor de cada fragmento quando havia mais de um. Os parâmetros para avaliação histológica da esteatose, da atividade inflamatória e da fibrose foram graduados e estadiados de forma semiquantitativa.

Dos prontuários foram anotados informes clínicos que justificaram a realização da biópsia percutânea: peso; altura; IMC; presença ou não de obesidade; uso abusivo de álcool; doenças associadas (HAS, diabetes mellitus tipo 2 e/ou resistência à insulina (DM/RI) e hipercolesterolemia); bilirrubina total, direta e indireta; ALT; AST; GGT; sorologia para vírus B e C; presença de auto-anticorpos; uso de drogas hepatotóxicas; glicemia; colesterol total; lipoproteína de alta densidade (HDL); lipoproteína de baixa densidade (LDL); VLDL; triglicerídeos; resultado do ultra-som abdominal e outros possíveis exames de imagem (vide anexo 2).

Com relação às características relacionadas à Síndrome metabólica foram considerados obesos aqueles pacientes que apresentaram IMC maior ou igual a 30 ou os descritos pelo médico como obesos, mas nos quais não havia anotações quanto ao peso e/ou altura. O paciente foi considerado hipertenso quando a pressão arterial estava maior que 130 x 85 mmHg em duas ou mais ocasiões ou quando ele fazia uso de anti-hipertensivos. A resistência à insulina foi diagnosticada quando a *impaired fasting glucose* era maior ou igual a 110 mg/dl e diabetes mellitus quando a glicemia de jejum era maior que 126 mg/dl. Pacientes em uso de hipoglicemiantes orais também foram considerados diabéticos. Os níveis de colesterol foram considerados alterados quando: colesterol total > 200 mg/dl, HDL menor que 40 mg/dl para homens e menor que 50 mg/dl para

mulheres. Hipertrigliceridemia foi diagnosticada quando os valores eram maiores que 150 mg/dl. Pacientes classificados como portadores da Síndrome metabólica deveriam ter pelo menos três dessas características (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001).

As dosagens de ALT, AST e GGT foram realizadas em laboratórios diferentes que utilizaram diferentes valores de referência em sua análise. Para que se pudesse avaliar alterações nos valores dos exames foi considerada a mediana (“valor do meio”, ou seja, aquele que deixa 50% dos dados acima e 50% abaixo) dos valores de referência citados nos prontuários. Para AST e ALT a mediana foi 40U/L e para GGT foi 45U/L. Para cada caso foi calculada a relação AST/ALT.

A graduação do ferro nos hepatócitos foi feita através da seguinte classificação (Searle et al, 1994):

- 0 – Grânulos ausentes ou pouco discerníveis no aumento de 400X.
- +1 – Grânulos pouco discerníveis no aumento de 250X. Facilmente confirmados no aumento de 400X.
- +2 – Grânulos discretos no aumento de 100X.
- +3 – Grânulos discretos no aumento de 25X.
- +4 – Massas visíveis no aumento de 10X ou a olho nu.

A análise descritiva dos resultados foi realizada no programa estatístico SPSS 9.0. Para testar as relações entre os informes clínicos (obesidade, HAS, DM/RI, hipercolesterolemia, baixa concentração de HDL, aminotransferases hepáticas e GGT elevadas) e as três principais variáveis histológicas estudadas (esteatose macrovacuolar, atividade inflamatória lobular e fibrose) e dessas três entre si foram utilizados o teste do X^2 e o teste exato de Fisher (Soares & Siqueira, 2002). Para avaliar a concordância interobservador foi utilizado o teste Kappa ponderado (Jakobsson & Westergren, 2005; Sim & Wright, 2005) do programa Stata 7.0. O coeficiente Kappa ponderado (K_w) foi interpretado conforme a tabela 2 (Altman, 1991). Utilizando a correção de Cross-Chaffin (correção do erro alfa) (Cross & Chaffin, 1982) para múltiplos testes o valor de p foi corrigido de 0,05 para 0,0027. Portanto os testes foram considerados como estatisticamente significativos quando $p < 0,0027$.

Valor do coeficiente K_w	Interpretação
Abaixo de 0,2	Concordância baixa
0,21 a 0,40	Concordância fraca
0,41 a 0,60	Concordância moderada
0,61 a 0,80	Concordância boa
Acima de 0,80	Concordância muito boa

Tabela 2: Interpretação do teste Kappa ponderado

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, parecer número ETIC 534/04 (vide anexo 3).

RESULTADOS

Dos 70 casos estudados, 25 (35,7%) pertenciam a pacientes do sexo feminino e 45 (64,3%) a indivíduos do sexo masculino (gráfico 1).

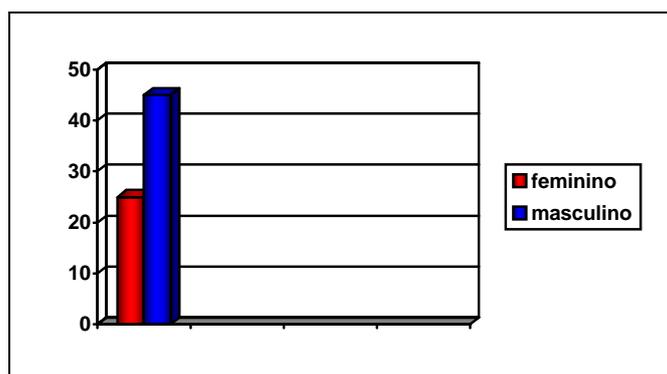


Gráfico 1: Números absolutos da distribuição por sexo.

A média e a mediana da idade foram semelhantes, sendo a primeira de 42,8 anos e a segunda de 42 anos. A idade mínima foi de 21 anos e a máxima de 73 anos. As mulheres apresentaram idade média de 47,2 anos e os homens de 40,4 anos.

Em 47 pacientes foi obtida informação a respeito da existência ou não de obesidade. Desses 47 pacientes, 25 (53,2%) eram obesos e 22 (46,8%) não obesos. Dos 25 obesos, 17 apresentaram IMC maior que 30 e nos 8 casos restantes havia apenas o relato clínico de obesidade (IMC não calculado). Dos 22 não obesos, 19 apresentaram IMC menor que 30 e três foram clinicamente descritos como não obesos.

Em 64 pacientes nos quais havia informação sobre os níveis pressóricos, apenas 19 (29,7%) eram hipertensos.

Em 45 pacientes foram obtidas informações sobre o perfil glicêmico. Doze (26,6%) indivíduos foram classificados como diabéticos tipo 2 ou resistentes à insulina. Em 10 deles os valores da glicemia de jejum estavam disponíveis e nos 2 casos restantes o médico informou sobre a presença de DM/RI.

A dosagem de colesterol total pôde ser avaliada em 53 pacientes. Vinte e sete (51,0%) apresentaram níveis de colesterol total acima de 200 mg/dl. O HDL estava abaixo dos valores esperados em 22 (46,8%) de 47 pacientes.

Do total de 44 pacientes com níveis de triglicérides disponíveis, 26 (59,1%) apresentaram valores acima de 150 mg/dl.

No gráfico 2 estão considerados o número absoluto de pacientes com cada um dos componentes da Síndrome metabólica e o número de casos não avaliáveis. O resumo dos dados clínicos e laboratoriais pode ser visto na tabela 2.

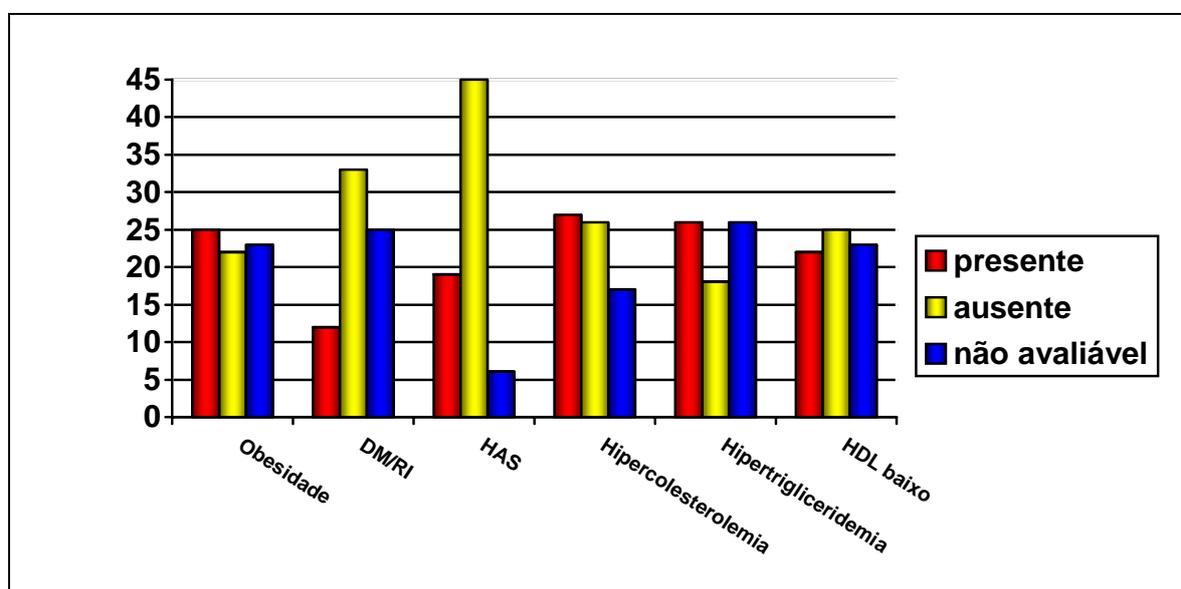


Gráfico 2: Número absoluto de pacientes com diagnósticos de obesidade, DM/RI, HAS, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e níveis de HDL baixos.

Do total de 70 pacientes, 17 (24,3%) apresentaram critérios para serem classificados como portadores da Síndrome metabólica.

Trinta e um (49,2%) de 63 pacientes apresentaram AST acima do valor de referência considerado (40 U/L); 49 (75,4%) de 65 mostraram ALT acima do valor de referência considerado (40 U/L). A relação AST/ALT foi menor que um em 59 casos (84,3%). Quarenta e dois (71,2%) de 59 casos exibiam GGT acima de 45 U/L (tabela 3).

Dados clínico/laboratoriais	Número de casos (n)	Média	Valor mínimo-máximo	nº de casos com valores alterados (%)
IMC (Kg/m ²)	36	29,74	20,2 - 43,2	17 (56,6)
AST (U/L)	63	48,55	16 - 198	31 (49,2)
ALT(U/L)	65	75,92	10 - 289	49 (75,4)
GGT (U/L)	59	117,07	12 - 574	42 (71,2)
Glicemia de jejum (mg/dl)	43	102,93	74 - 230	10 (23,3)
Colesterol total (mg/dl)	53	203,73	100 - 327	27 (51,0)
HDL (mg/dl)	47	45,28	26 - 73,7	22 (46,8)
Triglicerídeos (mg/dl)	44	189,73	46 - 697	26 (59,1)

Tabela 3: Achados clínicos e laboratoriais disponíveis dentre os 70 casos estudados.

A ultra-sonografia abdominal foi realizada nos 70 pacientes. Em três casos (4,3%) não se obteve o laudo do exame. Quatro pacientes (5,7%) apresentaram ultra-sonografia abdominal compatível com esteatose discreta, nove (12,9%) com esteatose moderada e 23 (32,9%) com esteatose acentuada. A esteatose foi quantificada como discreta/moderada em dois casos (2,9%) e como moderada/acentuada em sete (10%). Em 21 exames (30%) a esteatose não foi quantificada e em um exame o fígado apresentava-se com características dentro dos limites da normalidade (gráfico 3). Este paciente apresentava clinicamente aumento de AST e de GGT.

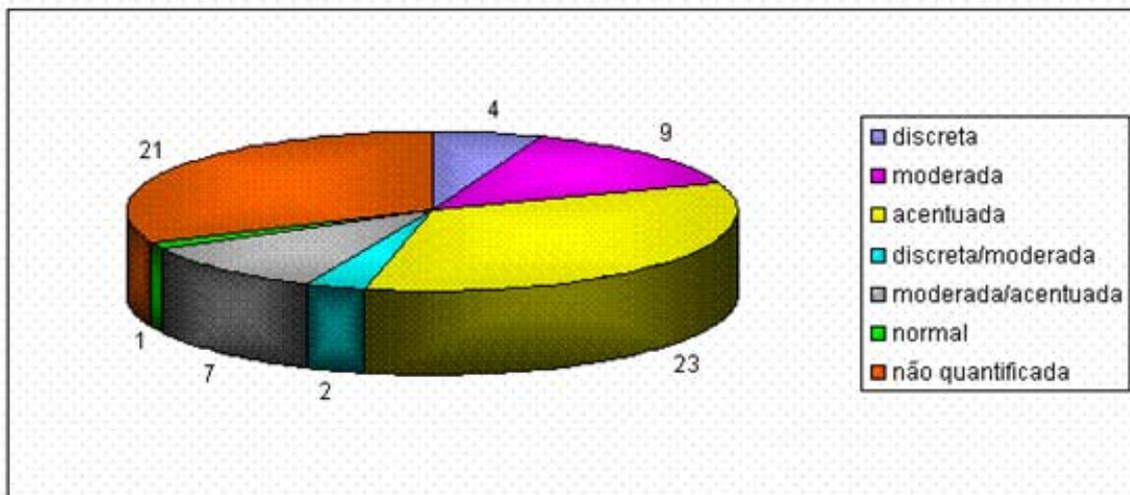


Gráfico 3: Distribuição dos diagnósticos ultra-sonográficos de esteatose hepática.

O tamanho das biópsias variou de 0,9 cm a 3,6 cm, com média e mediana de 1,8 cm. O número de fragmentos em cada caso variou de um a 12. As amostras apresentaram em média 10,6 tratos portais e 8,9 veias centro-lobulares, com mínimo de cinco tratos portais e cinco veias centro-lobulares conforme estipulado. Em dois casos classificados como de cirrose hepática, as estruturas acima não foram avaliadas.

Vinte e nove casos (41,4%) mostraram esteatose macrovacuolar de intensidade discreta, 23 (32,9%) apresentaram esteatose moderada e 18 (25,7%) biópsias exibiram esteatose acentuada (figuras 1 e 1B; gráfico 4).

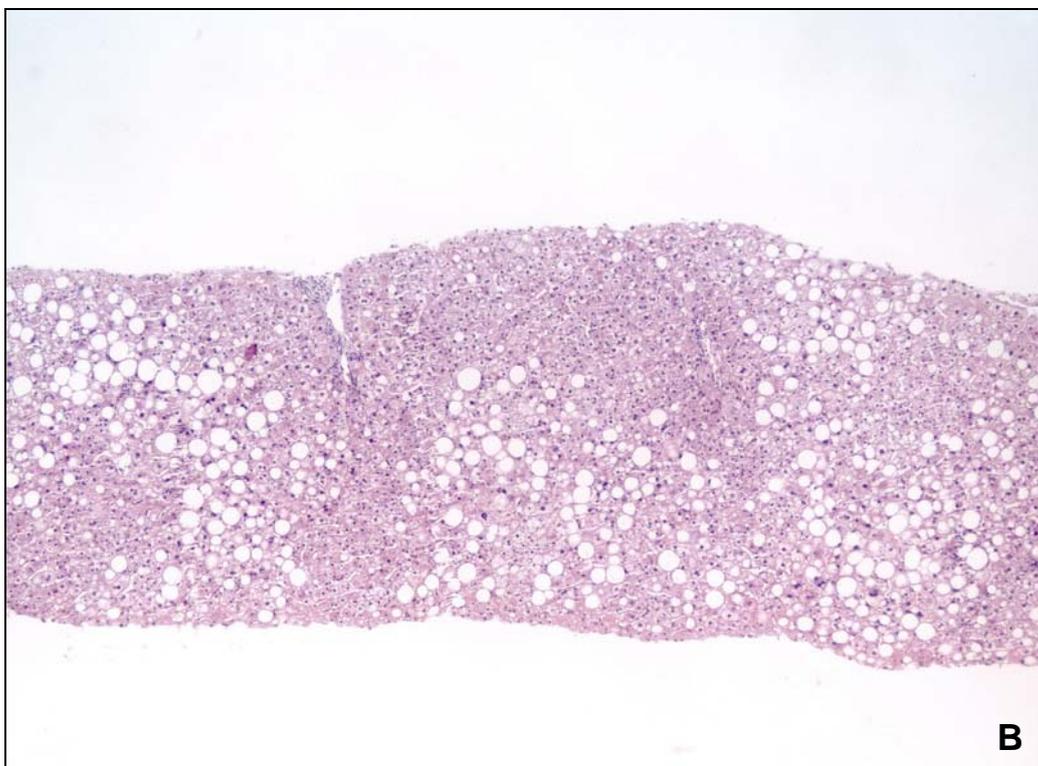
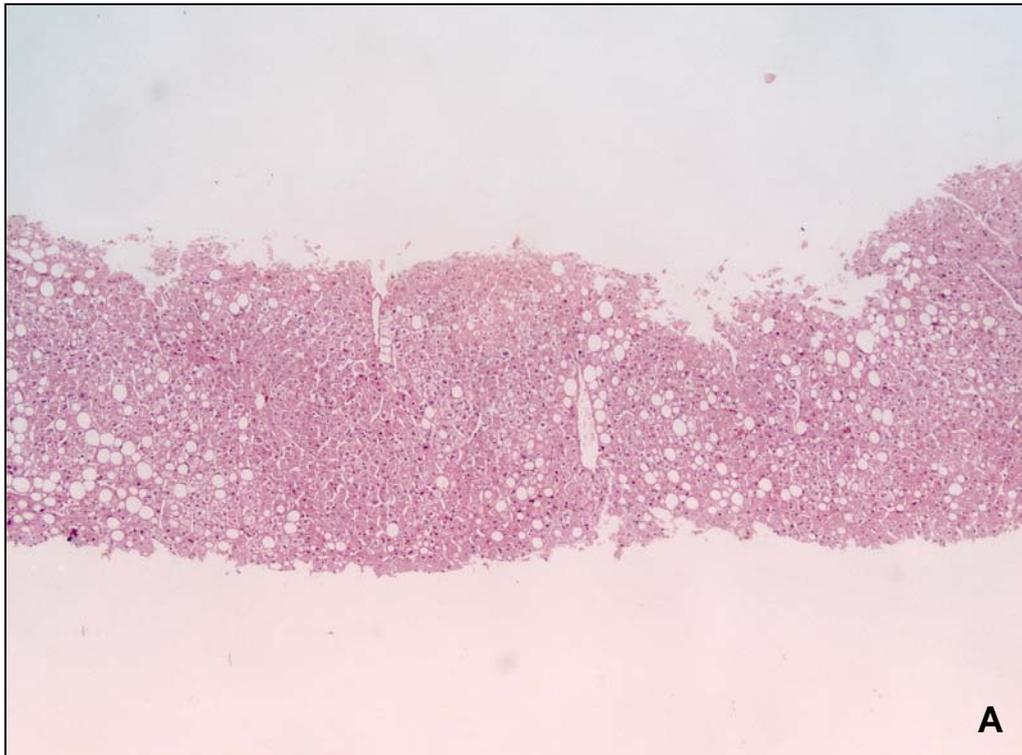


Figura 1: Graduação da esteatose: **A-** Esteatose discreta (HE, 50X); **B-** Esteatose moderada (HE, 50X).

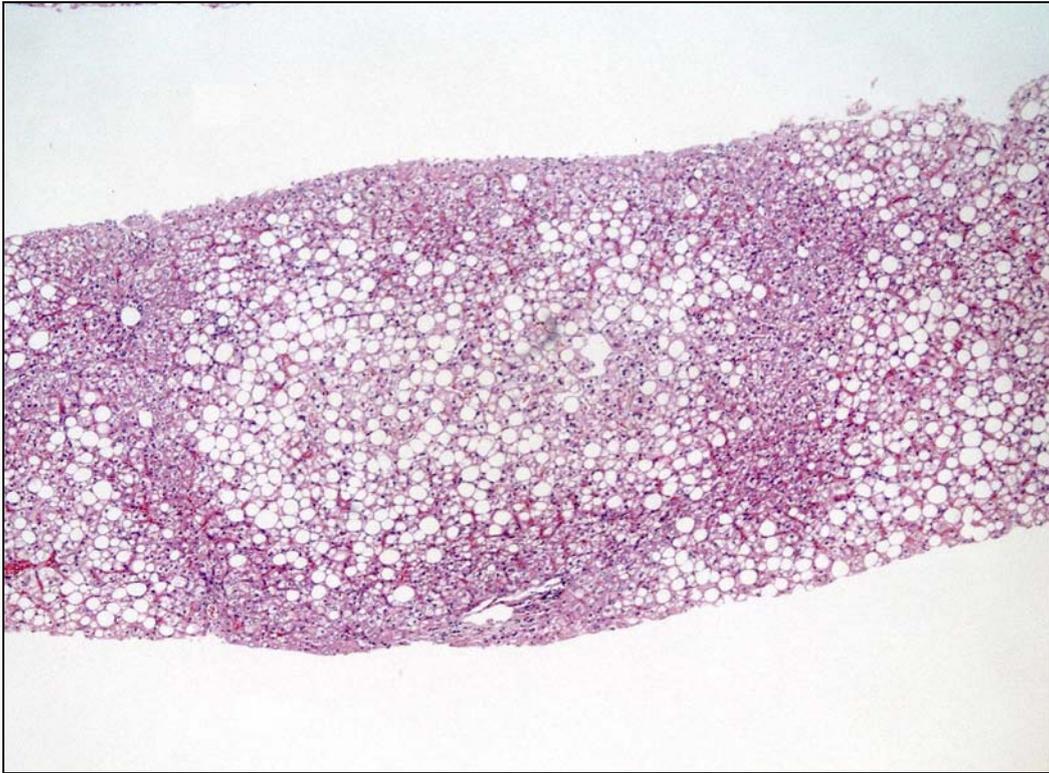


Figura 1B: Graduação da esteatose: Esteatose acentuada(HE, 50X).

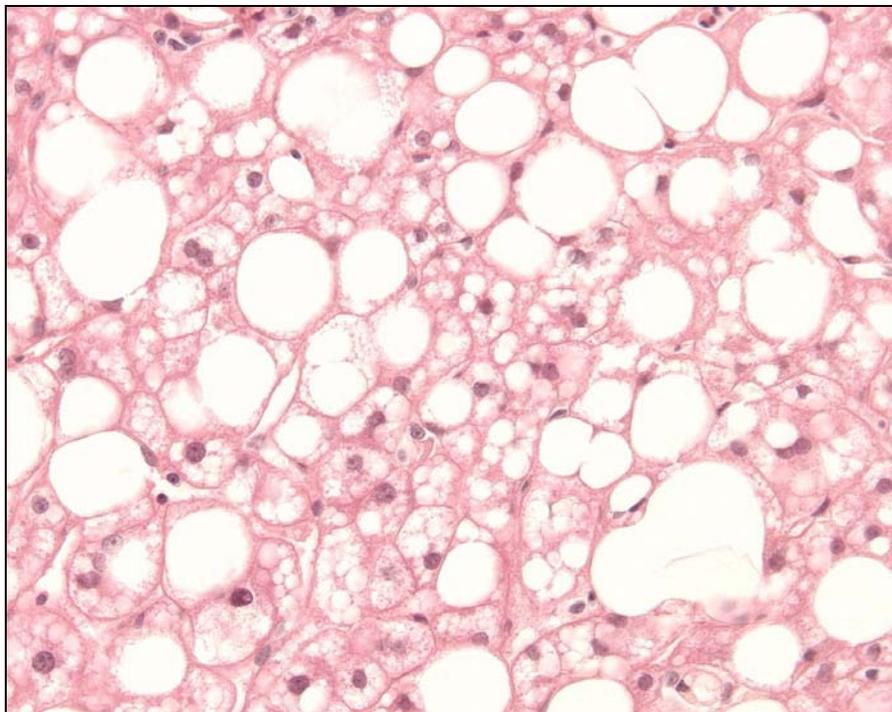


Figura 2: Esteatose microvacuolar em meio à esteatose macrovacuolar (HE, 400X).

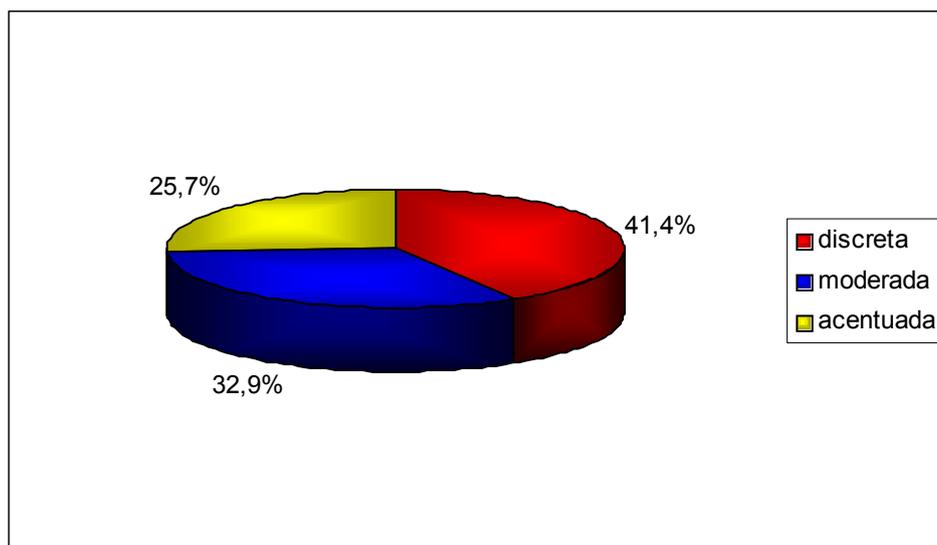


Gráfico 4: Distribuição (%) da esteatose macrovacuolar.

Em 46 (65,7%) casos a esteatose estava difusamente distribuída, ou seja, presente nas três zonas do ácino. Quando difusa, predominavam as intensidades de esteatose moderada e acentuada (36/46), mas casos (10/46) que exibem esteatose discreta podem ter distribuição difusa no ácino. Em 22 (31,4%) casos ela se restringiu às zonas 2 e 3. Nos 2 (2,9%) casos classificados como de cirrose não se topografou a esteatose (tabela 4).

A esteatose microvacuolar (figura 2) foi identificada em 42 (60%) amostras. Ela associou-se à esteatose discreta em 13/29 (44,8%) casos, à esteatose moderada em 14/23 (60,9%) casos e 15/18 (83,3%) casos de esteatose acentuada. Além disso, observou-se esteatose microvacuolar em 11/20 (55%) casos sem atividade inflamatória lobular associada.

A balonização hepatocitária foi ocasional em 39 (55,7%) biópsias e freqüente em 31 (44,3%). Em 43 (61,4%) casos ela distribuiu-se nas três zonas e em 25 (35,7%) ela ocorreu nas zonas 2 e 3. Nos dois casos classificados como de cirrose a avaliação topográfica da balonização não foi realizada (tabela 3).

Os núcleos glicogenados em hepatócitos (figura 5) não foram identificados em 37 (52,9%) das 70 biópsias. Nos 33 casos restantes, em 18 (54,5%) eles foram vistos ocasionalmente e em 15 (45,4%), com freqüência. Eles se

localizaram na zona 1 em 23 (69,7%) amostras, nas zonas 1, 2 e 3 em nove (27,3%) e em um (3%) caso de cirrose não foi feita a avaliação topográfica (tabela 4). Não houve relação estatisticamente significativa entre a ocorrência de DM/RI e a de núcleos glicogenados ($X^2 = 0,89$; $p = 0,34$).

	Zona 1	Zonas 2/3	Zonas 1, 2 e 3	Não topografado	Total
Esteatose macrovacuolar	0	22 (31,4%)	48 (65,7%)	2 (2,9%)	70
Balonização	0	25 (35,7%)	43 (61,4%)	2 (2,9%)	70
Núcleos glicogenados	23 (69,7%)	0	9 (27,3%)	1 (3,0%)	33

Tabela 4: Distribuição zonal da esteatose macrovacuolar, balonização e núcleos glicogenados.

A inflamação nos tratos portais foi ausente em 34 (48,6%) casos, discreta em 31 (44,3%) e moderada em 3 (4,3%). Nos dois casos classificados como de cirrose a inflamação nos tratos portais não foi avaliada. O infiltrado inflamatório era composto por mononucleares em 20 (58,8%) das biópsias e por mono e polimorfonucleares em 14 (41,2%).

A atividade inflamatória lobular, considerada presente quando o foco inflamatório continha polimorfonucleares neutrófilos, foi detectada em 50 (71,4%) casos. Quarenta e três (61,4%) biópsias mostraram inflamação discreta; cinco (7,1%) exibiram inflamação moderada e duas (2,9%) foram classificadas como de inflamação acentuada (gráfico 5 e figuras 3 e 3B). Esses dois últimos casos correspondem aos de cirrose. Em 20 (28,6%) amostras não se identificou atividade inflamatória lobular.

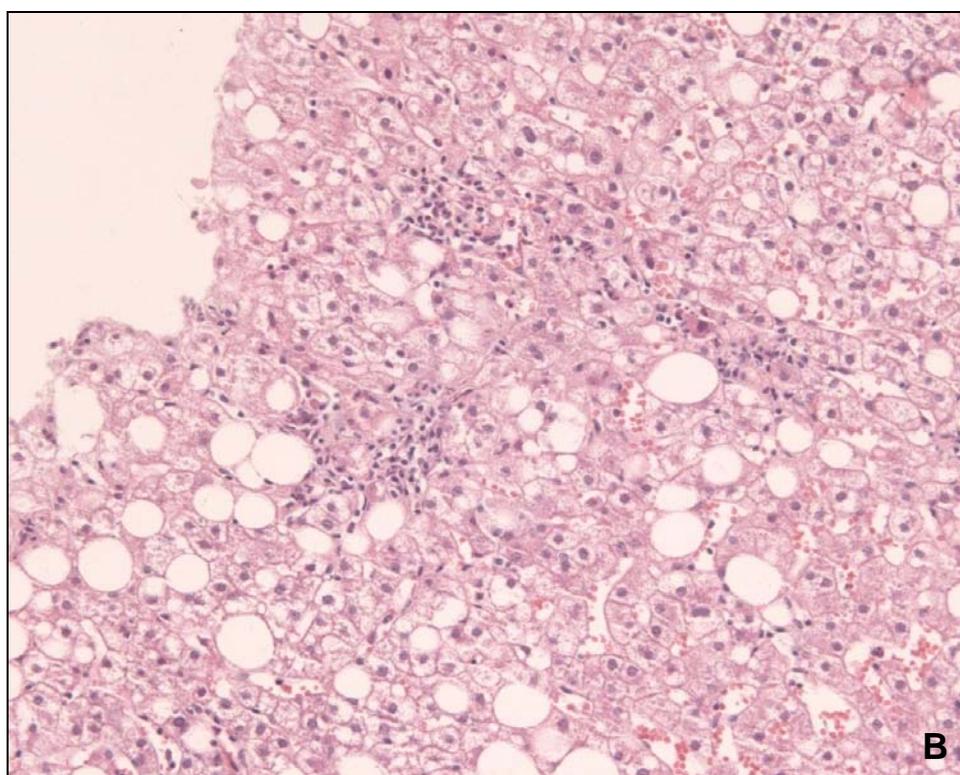
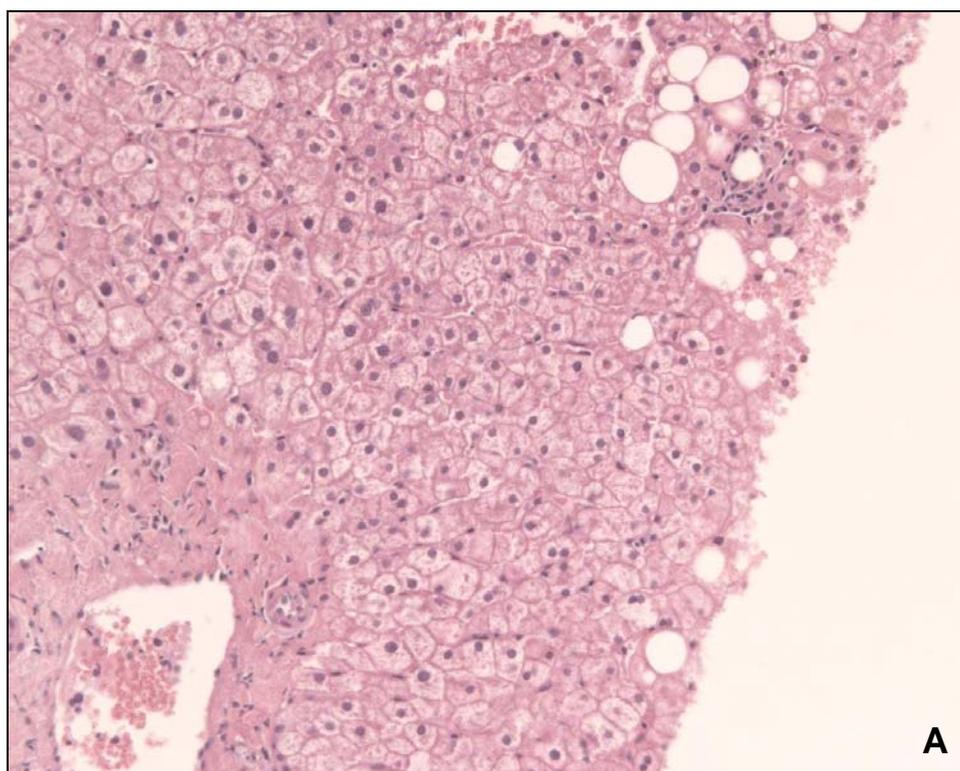


Figura 3: Graduação da inflamação: **A** – Inflamação discreta (HE, 200X); **B** – inflamação moderada (HE, 200X)

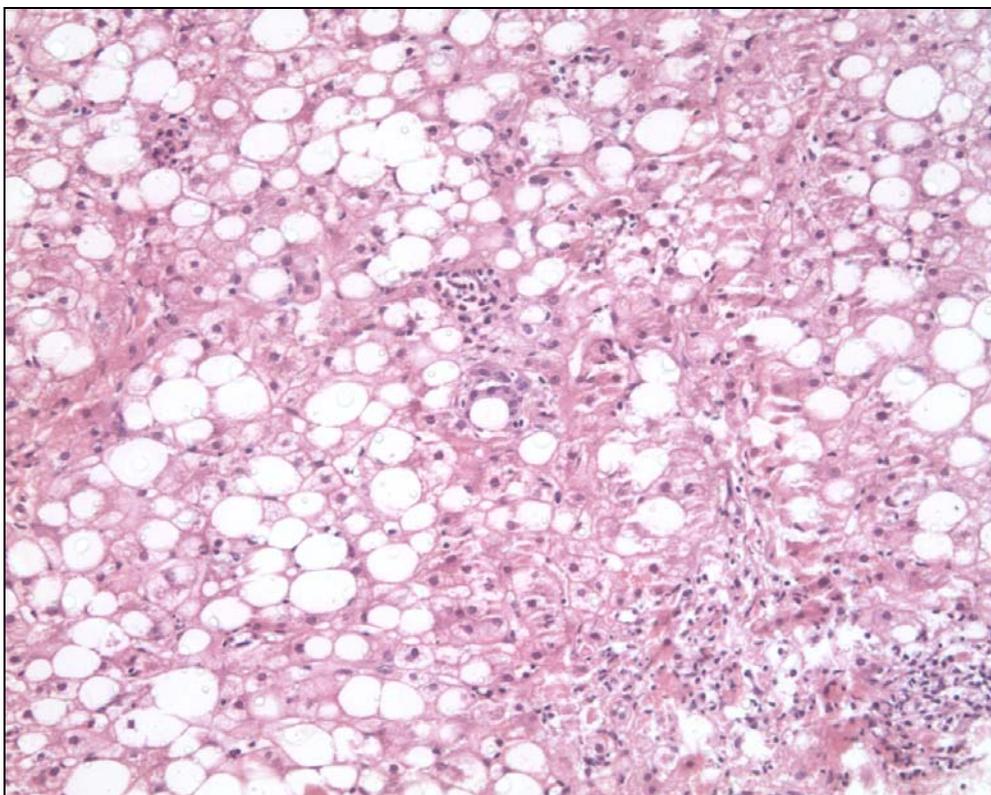


Figura 3B : Graduação da inflamação: Inflamação acentuada (HE, 200X).

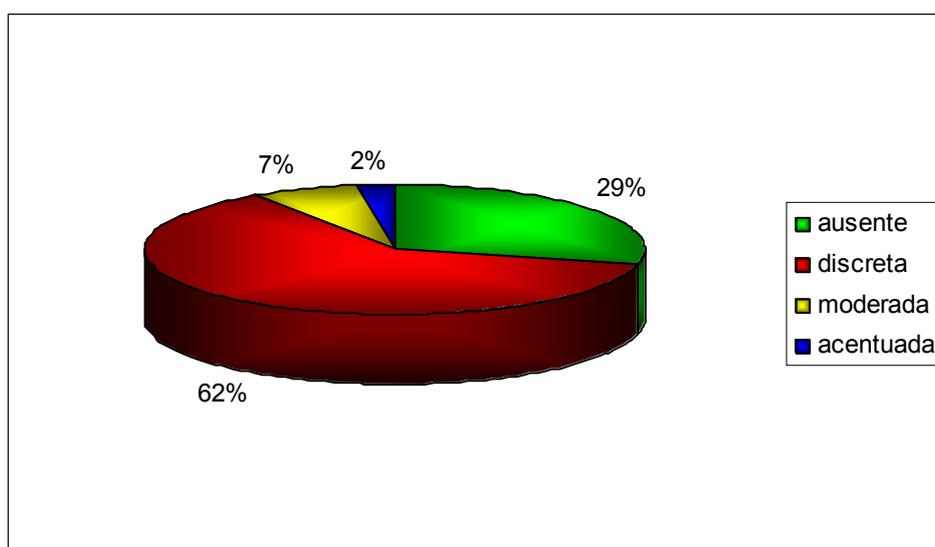


Gráfico 5: Distribuição (%) da atividade inflamatória lobular.

Dos 50 pacientes com EENA, 31 (62%) eram homens. Do total de 45 pacientes do sexo masculino, 31 (68,9%) apresentavam EENA e das 25 mulheres, 19 (76%) mostravam EENA. Dezoito (72%) dos obesos e 8 (81,8%) dos não obesos; 11 (57,9%) dos hipertensos e 34 (75,5%) dos não hipertensos; seis (50%) dos diabéticos/resistentes à insulina e 27 (81,8%) dos não diabéticos/resistentes à insulina; 20 (74%) dos pacientes com hipercolesterolemia e 17 (65,4%) dos com níveis normais de colesterol total; 16 (72,7%) dos pacientes com baixos níveis de HDL e 17 (68%) dos com níveis de HDL dentro dos limites da normalidade; 22 (84,6%) dos pacientes com hipertrigliceridemia e 20 (55,5%) dos pacientes com níveis séricos de triglicérides normais apresentaram atividade inflamatória lobular.

Os lipogranulomas (figura 4) estiveram presentes em 25 (35,7%) casos.

Os hialinos de Mallory (figura 6) e a morte celular por apoptose de hepatócitos foram detectados em 10 (14,3%) e 17 (24,3%) amostras respectivamente. Os hialinos de Mallory não foram identificados em casos que mostraram apenas esteatose. Em todos os casos em que foram observados existia fibrose de algum grau.

O pigmento acastanhado de lipofuscina nos hepatócitos (figura 7) foi ausente em 25 (35,7%) e presente em 45 (64,3%) casos.

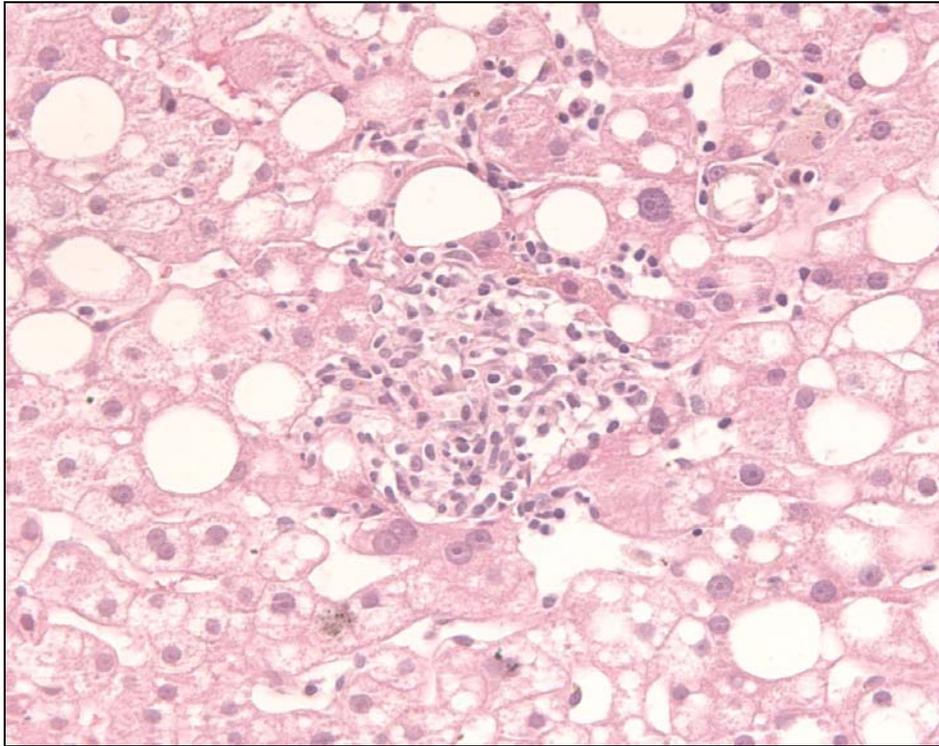


Figura 4: Lipogranuloma (HE, 400X).

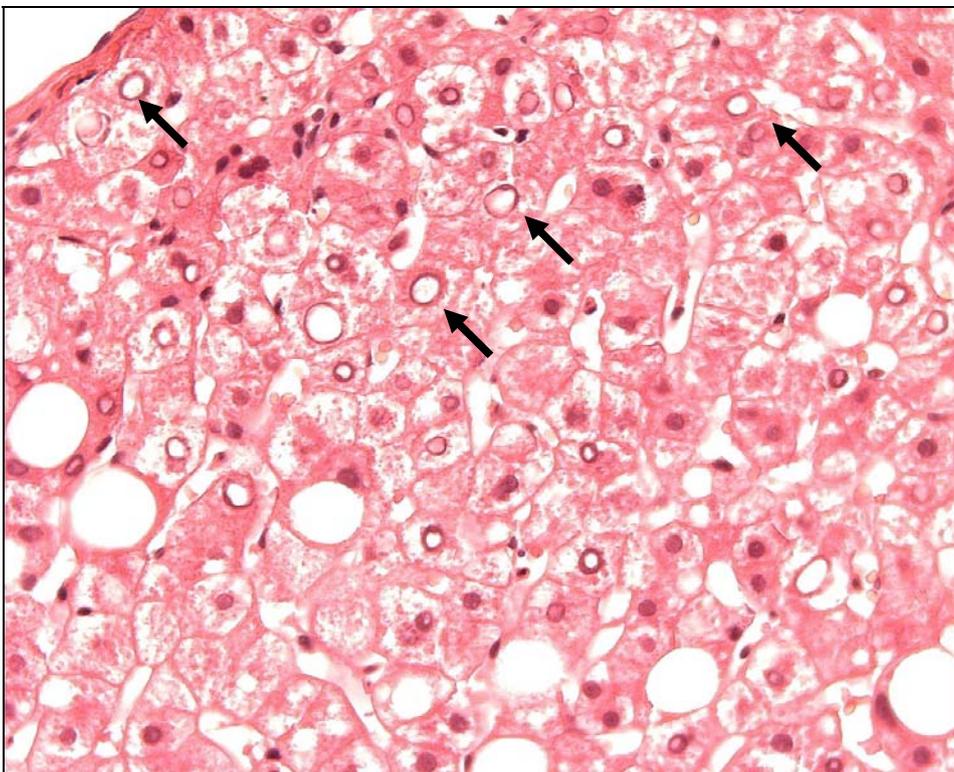


Figura 5- Núcleos glicogenados (setas) (HE, 400X).

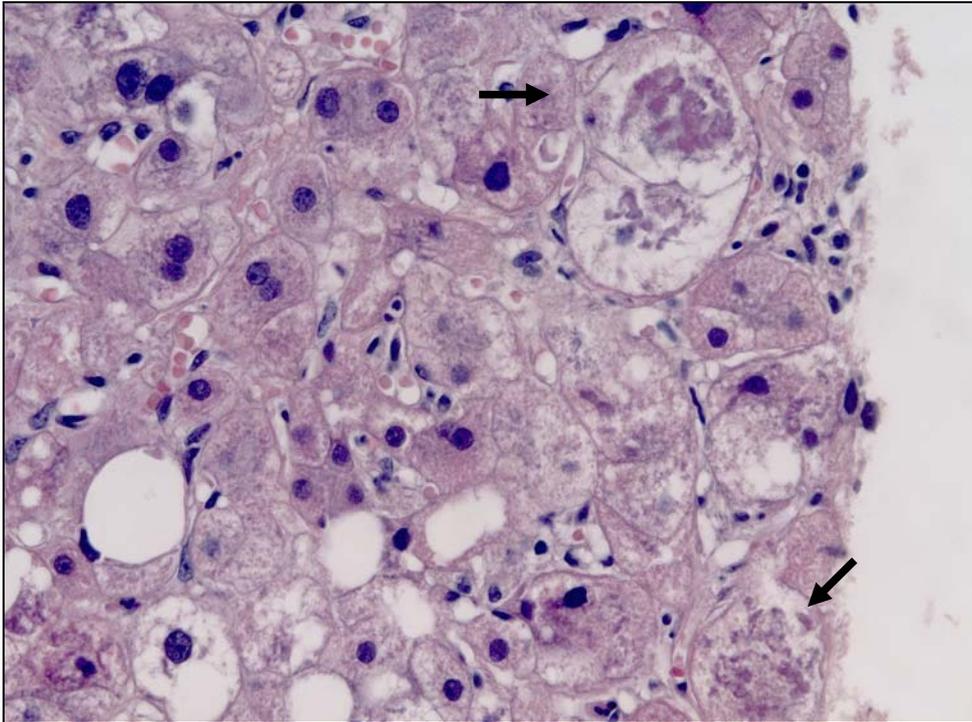


Figura 6: Hialinos de Mallory em hepatócitos balonizados (HE, 400X).

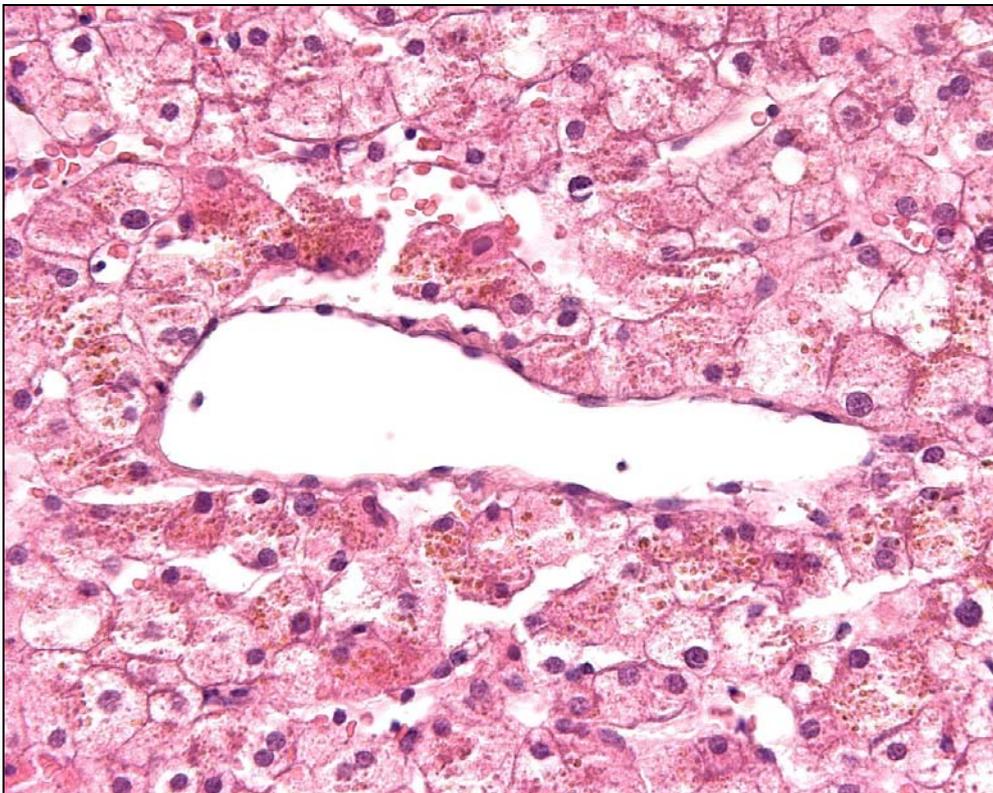


Figura 7: Presença de lipofuscina ao redor da veia centrolobular (HE, 400X).

O acúmulo de ferro, pesquisado através da coloração de Perls, foi ausente em 44 (62,9%) biópsias. Houve acúmulo de ferro no citoplasma dos hepatócitos em 4 (5,7%) casos, nas células de Kupffer em 6 (8,6%) e nos dois tipos celulares em 12 (17,1%) casos. Em quatro casos não houve material suficiente para pesquisa do ferro. O acúmulo de ferro nos hepatócitos foi classificado como grau 1 em 14 (87,5%) biópsias e como grau 2 em duas (12,5%) delas.

A fibrose foi ausente em 47 (67,1%) casos. Ela foi classificada como discreta em 12 (17,1%), moderada em sete (10%) e acentuada em dois (2,9%). Dois casos (2,9%) foram classificados como de cirrose hepática (gráfico 6 e figuras). Dos 17 pacientes com Síndrome metabólica, apenas seis (35,3%) apresentaram fibrose de algum grau.

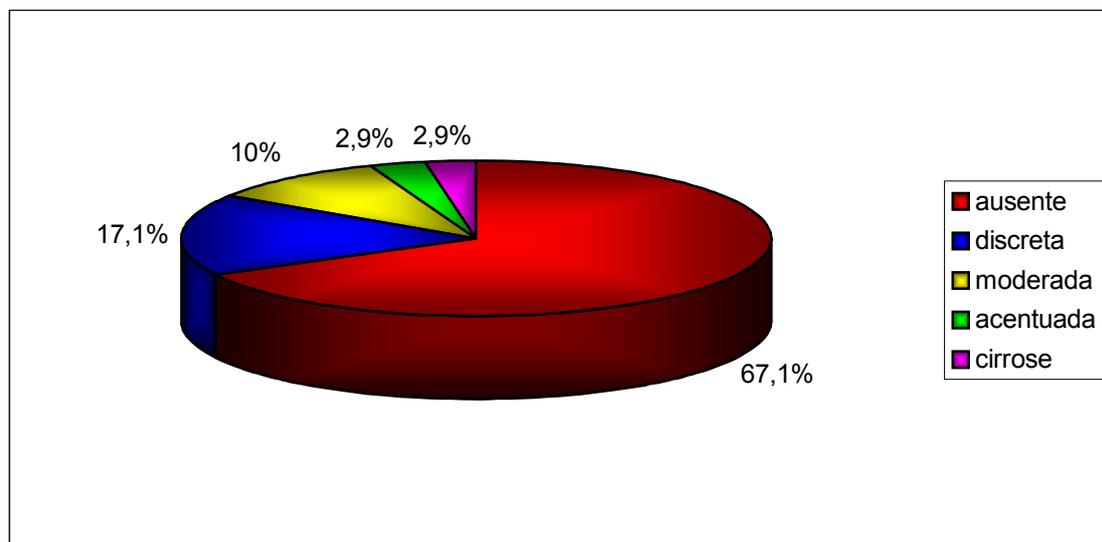


Gráfico 6: Distribuição (%) da fibrose.

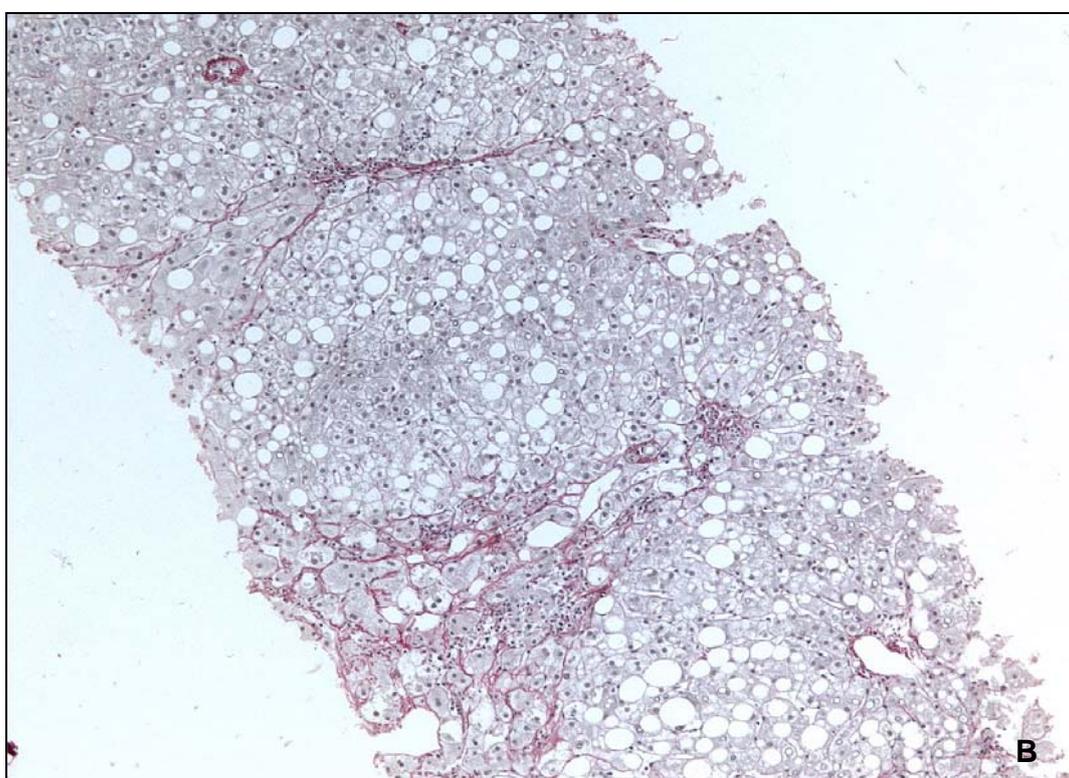
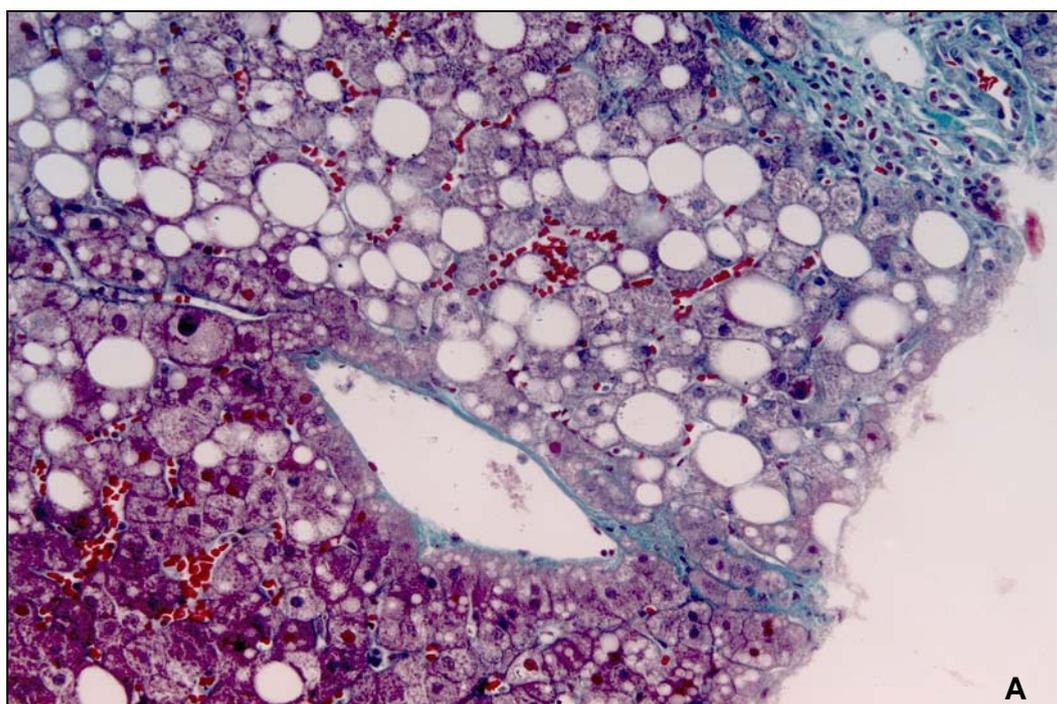


Figura 8: Estadiamento da fibrose: **A-** fibrose discreta (tricroômico de Gomori, 200X); **B-** fibrose moderada (Picrosírius, 100X).

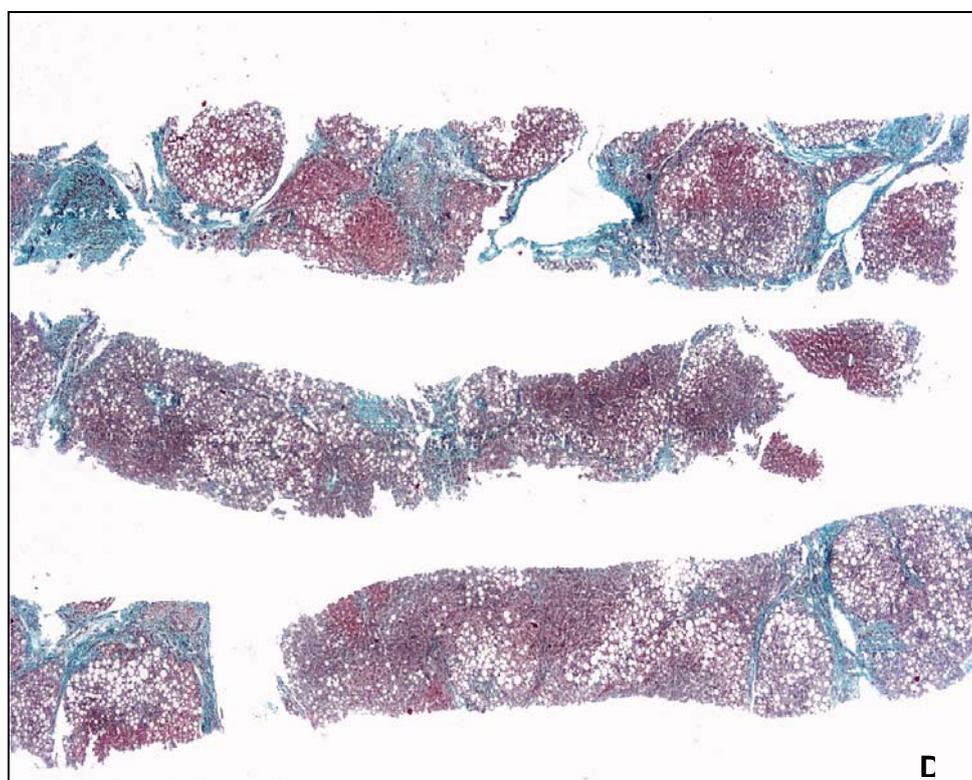
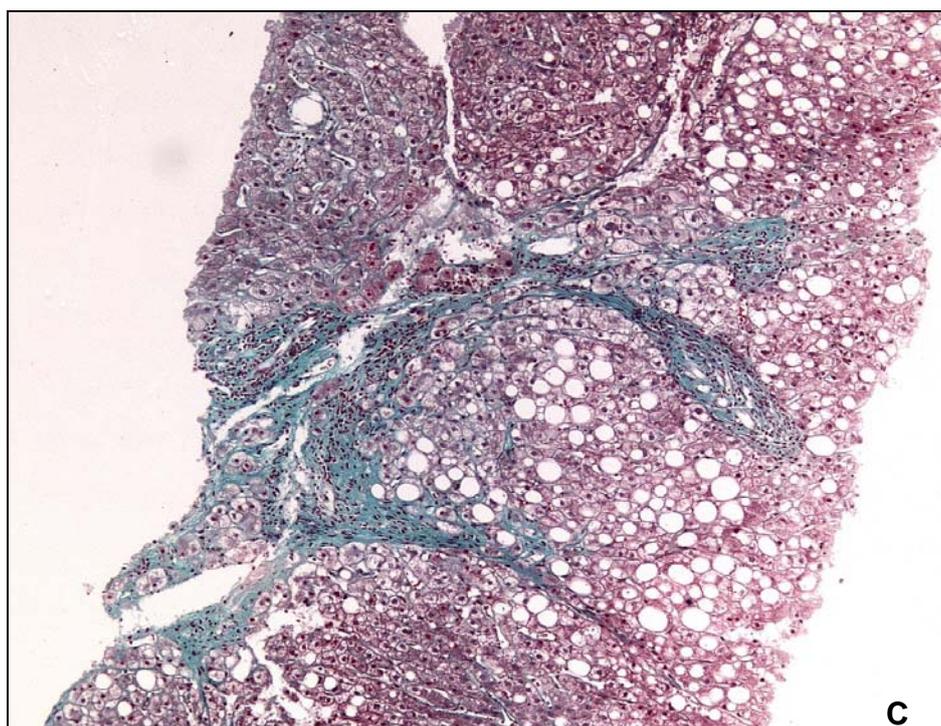


Figura 8B : Estadiamento da fibrose: **C-** fibrose acentuada (tricrômico de Gomori, 100X); **D-** cirrose (tricrômico de Gomori, 25X).

As tabelas 5, 6 e 7 mostram como se distribuíram a esteatose macrovacuolar, a atividade inflamatória lobular e a fibrose quando relacionadas umas com as outras.

		Gradação da atividade inflamatória				Total
		0	1	2	3	
Gradação da esteatose	1	14	13	1	1	29
	2	3	18	2	1	24
	3	3	12	2	0	17
	Total	20	43	5	2	70

Tabela 5: Distribuição dos graus de esteatose macrovacuolar em relação aos graus da atividade inflamatória lobular.

		Estadiamento da fibrose					Total
		0	1	2	3	4	
Gradação da esteatose	1	26	1	0	1	1	29
	2	10	8	4	1	1	24
	3	11	3	3	0	0	17
	Total	47	12	7	2	2	70

Tabela 6: Distribuição dos graus de esteatose macrovacuolar em relação aos estágios da fibrose.

		Estadiamento da fibrose					
Gradação da atividade inflamatória		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	Total
	0	20	0	0	0	0	20
	1	26	10	5	2	0	43
	2	1	2	2	0	0	5
	3	0	0	0	0	2	2
Total	47	12	7	2	2	70	

Tabela 7: Distribuição dos graus de atividade inflamatória lobular em relação aos estágios da fibrose.

A relação entre as variáveis histológicas principais (esteatose macrovacuolar, atividade inflamatória lobular e fibrose) foi estatisticamente significativa para as três hipóteses estudadas (tabela 8).

	Valor de p
Esteatose x inflamação	0,002*
Esteatose x fibrose	0,001*
Inflamação x fibrose	0,000*

Tabela 8: Valores de p para a relação entre as variáveis histológicas.

Não houve relação estatisticamente significativa entre os componentes da Síndrome metabólica (obesidade, DM/RI, hipercolesterolemia, baixos níveis de HDL e HAS) e as três principais variáveis histológicas (esteatose macrovacuolar, atividade inflamatória lobular e fibrose), conforme a tabela 9.

	Valor de P (χ^2 bicaudal)				
	Obesidade (n=47)	DM/RI (n=45)	Hipercolesterolemia (n=53)	HDL baixo (n=47)	HAS (n=64)
Esteatose	0,73	0,56	0,65	0,94	0,70
Inflamação	0,42	0,03	0,72	0,72	0,15
Fibrose	0,20	1,0	0,63	0,47	0,41

Tabela 9: Valores de p para o teste do χ^2 . Valor de $p < 0,0027$

A relação entre a AST e GGT elevadas e a atividade inflamatória também não se mostrou significativa. No entanto, a relação entre ALT e atividade inflamatória foi estatisticamente significativa, com valor muito próximo ao de p (tabela 10).

	AST (n=63)	ALT (n=65)	GGT (n=59)
Inflamação lobular	0,056	0,002*	0,612

Tabela 10: Valores de p para a relação entre aminotransferases hepáticas e GGT e atividade inflamatória lobular.

O teste Kappa ponderado mostrou concordância muito boa para esteatose macrovacuolar ($K_w=0,82$) e boa para atividade inflamatória lobular ($K_w= 0,68$) e para a fibrose ($K_w=0,73$).

DISCUSSÃO

Até 1990 os trabalhos relatavam que a EENA ocorria predominantemente em mulheres. Entretanto, alguns estudos mais recentes (Bacon et al, 1994; Adams et al, 2005) têm mostrado que tanto a DHGNA quanto a EENA ocorrem com igual frequência em homens e mulheres. Nesta pesquisa, 45 (64,3%) dos pacientes com DHGNA eram homens e 31 em 50 (62%) dos pacientes classificados como portadores de EENA também eram homens. Este trabalho confirma que não há o predomínio de mulheres conforme inicialmente se acreditava. Clark et al (2002) e Clark (2006) observaram que em vários grupos etários os homens apresentavam maior tendência a ter DHGNA do que as mulheres. Eles levantam a possibilidade dos hormônios femininos desempenharem papel protetor, pois a probabilidade de DHGNA era mais comum em mulheres pós-menopausa em comparação com mulheres pré-menopausa. Além disso, mulheres pós-menopausa que faziam reposição hormonal tinham menor probabilidade de ter DHGNA. Neste estudo, 76% (19/25) das mulheres apresentavam EENA e 68,9% (31/45) dos homens eram portadores da doença. As mulheres (47,2 anos) foram em média mais velhas que os homens (40,4 anos) e apresentaram maior tendência à inflamação. Vale ressaltar que, entre as mulheres, a idade média foi quase uma década maior que a idade média dos homens. Assim sendo, essa maior tendência à esteatoepatite no sexo feminino poderia ser explicada pela falta do papel protetor hormonal sugerida por Clark et al (2002) e Clark (2006). A tabela 11 resume os achados clínicos/laboratoriais de séries de pacientes com DHGNA. Nesta pesquisa a média da idade para DHGNA foi de 42 anos, o que está ligeiramente abaixo da referida nos artigos considerados na tabela 11 (variou entre 47 e 54 anos). Segundo Sanyal (2002) prevalência mais alta de DHGNA é observada justamente entre 40 e 49 anos, o que corrobora os achados desta pesquisa.

Autores	n	Idade média	Sexo feminino (%)	Obesidade (%)	Diabetes Mellitus tipo 2 (%)	Hipertrigliceridemia (%)
Ludwig et al (1980)	20	54	65	90	50	67
Lee (1989)	49	53	78	69	51	NR
Powell et al (1990)	42	49	83	95	36	81*
Bacon et al (1994)	33	47	42	39	21	21*
Matteoni et al (1999)	132	53	51,5	52	22	NR
Adams et al (2005)	435	49	51	71	26	68

Tabela 11: Achados clínicos/laboratoriais de séries de pacientes com DHGNA.

NR = não relatado;

*Valores relativos a pacientes hiperlipidêmicos, sem especificação quanto ao tipo de hiperlipidemia (hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia).

Neste estudo a prevalência de pacientes obesos foi de 53,2% (25/47), a de DM/RI foi de 26,6% (12/45) e a de pacientes com hipertrigliceridemia foi de 59,1% (26/44). Nos trabalhos consultados na literatura a prevalência de obesidade foi de 39 a 95% dos pacientes, a de diabetes foi de 21 a 51% e a de hipertrigliceridemia foi de 67-68% (vide tabela 11). A hipertensão arterial foi diagnosticada em 29,7% (19/64) dos casos neste estudo, taxa essa que se encontra entre os 15% relatados por Ludwig et al (1980) e os 36% referidos por Adams et al (2005). Apesar do grande número de perdas e da dificuldade em se obter as informações clínicas dos pacientes, os valores encontrados aqui para diabetes, obesidade e HAS corroboram os relatados na literatura; o mesmo não ocorrendo para o achado de hipertrigliceridemia, o qual se encontra abaixo dos valores citados. Adams et al (2005) encontraram baixos níveis séricos de HDL em 33% (117/359) dos casos, porcentagem menor que a deste estudo que foi de 46,8% (22/47). No entanto, só foram biopsiados 84 casos da amostra de 435 pacientes, não havendo portanto a confirmação histológica da DHGNA. Com relação às medidas de colesterol sérico

total, poucos são os estudos que referem detalhadamente seu valor. Ludwig et al (1980) relatam que 36% dos seus casos apresentavam hipercolesterolemia, o que contrasta com os 51% encontrados neste estudo. Matteoni et al (1999) mostraram que, em média, os pacientes têm níveis de colesterol acima dos considerados aceitáveis, qualquer que seja a gravidade da doença.

O componente da Síndrome metabólica mais freqüentemente associado à DHGNA nesta pesquisa foi a hipertrigliceridemia, seguido pela obesidade. DM/RI foi a condição menos freqüentemente associada, apesar de a resistência à insulina ser considerada uma das alterações básicas da doença. Do total de 70 pacientes, apenas 17 (24,3%) apresentaram critérios para serem classificados como portadores da Síndrome metabólica. Este resultado mostra que se deve considerar a DHGNA como uma hipótese diagnóstica mesmo que o paciente não apresente os critérios para Síndrome metabólica, pois pacientes euglicêmicos, magros e sem dislipidemias podem apresentar alguma forma da DHGNA. Bacon et al (1994) já alertavam que o grupo acometido por esta doença hepática era bem maior do que aquele de mulheres obesas de meia idade originalmente descrito por Ludwig et al (1980).

Os valores médios de AST variam bastante na literatura, indo de 41 U/L (Brunt, 2004) a 89 U/L (Lee, 1989). O mesmo é observado para ALT com valores médios de 53 U/L (Brunt, 2004) a 96 U/L (Powell et al, 1990). Os valores médios dos casos estudados nesta pesquisa foram de 48,6 U/L para AST e 75,9 U/L para ALT, estando dentro dos valores relatados previamente. Apesar dos exames laboratoriais terem sido feitos em épocas diferentes, em laboratórios diferentes e com *kits* de análise diferentes, acreditamos que ao tomarmos por valor de corte da normalidade o valor de referência mediano, ocorre anulação das diferenças.

A ALT estava aumentada com mais freqüência (75,4%) que a AST (49,2%). A maioria dos casos (59 pacientes – 84,3%) mostrou relação AST/ALT menor que um, confirmando os achados de Diehl et al (1988) e Matteoni et al (1999) que mostraram que a relação AST/ALT é geralmente menor que um na DHGNA. A tabela 12 mostra os casos que apresentaram relação AST/ALT maior que um.

Nº do caso	AST/ALT	Esteatose macrovacuolar	Atividade inflamatória	Estadiamento
15	1,12	1	0	0
17	1,17	1	0	0
22	1,40	1	1	3
26	1,41	1	3	4
28	1,66	2	2	2
34	1,10	2	0	0
40	1,17	3	2	2
49	1,09	2	1	0
50	1,03	1	0	0
64	1,60	3	0	0
68	1,09	3	1	0

Tabela 12: Relação AST/ALT e seus respectivos achados histológicos.

Três dos quatro casos com valores maiores que 1,4 mostraram fibrose pelo menos de intensidade moderada, indicando doença mais grave, conforme relatado por Matteoni et al (1999) e Falck-Ytter et al (2001). Angulo et al (1999), identificaram fatores preditivos de fibrose hepática acentuada em pacientes com EENA através de análise multivariada; dentre estes fatores consideraram a relação AST/ALT >1 significativamente correlacionada com fibrose avançada. O caso de número 64 desta pesquisa apresentou relação AST/ALT de 1,6 e revelou apenas esteatose acentuada, sem fibrose ou atividade inflamatória lobular. Bacon et al (1994) encontraram três pacientes com valores de AST/ALT >1; apenas dois deles apresentavam cirrose, não havendo nenhuma explicação sobre o porquê do terceiro caso apresentar relação alterada. Com base nos dados disponíveis não se sabe qual o motivo da elevação da AST/ALT para o caso 64 deste estudo. Os demais valores alterados são bem próximos de um e podem não refletir um aumento verdadeiro da AST/ALT.

A esteatose macrovacuolar de intensidade discreta foi a mais freqüente, 41,4% (29/70), seguida pela forma moderada, 32,9% (23/70) e depois pela acentuada, 25,7% (18/70). Brunt et al (2004) e Adams et al (2005) também observaram distribuição semelhante, na mesma ordem crescente de incidência, sendo que a esteatose discreta correspondeu a 37% e 46% dos casos,

respectivamente. Silverman et al (1990) encontraram porcentagens de 42, 20 e 24% respectivamente. Lee (1989) encontrou a esteatose acentuada como a forma mais comum. No presente trabalho topografaram-se as lesões como pertencentes às zonas 2 e 3 ou às 3 zonas (panacinar). Tal conduta se deve ao fato de que não existem limites nítidos entre as zonas do ácino e freqüentemente as lesões da zona 3 se estendem à zona 2. Tal distribuição nas zonas 2 e 3 é comparável a de outros autores que citam apenas a zona 3 como a mais acometida (Brunt, 2001; Brunt et al, 2004). Em mais da metade dos casos (65,7% - 46/70) a distribuição foi difusa, não havendo preferência por uma zona específica. Quando difusa, predominam a esteatose moderada e acentuada (36/46), mas casos que exibem esteatose discreta podem ter distribuição difusa no ácino. Nos 22 casos nos quais a esteatose se restringiu às zonas 2 e 3, a grande maioria (18/22 – 81,2%) mostrava esteatose discreta. Nas quatro (18,2%) biópsias restantes a esteatose foi classificada como moderada. Ela não poderia ser acentuada já que as zonas 2 e 3 correspondem a 66% do ácino hepático.

A associação da esteatose macrovacuolar com a microvacuolar foi bastante freqüente, ocorrendo em 60% (42/70) dos casos. Na literatura tal associação variou de 34,1% (Gramlich et al, 2004) a 59% (Diehl et al, 1988). Mendler et al (2005) observaram também que a maioria dos casos mostra esteatose macro e microvacuolar. Brunt (2001) relata que a esteatose microvacuolar apareceria geralmente nos casos mais graves. Neste trabalho, ela foi presente em 83,3% (15/18) dos casos de esteatose macrovacuolar acentuada, aparecendo em menor freqüência nos casos de esteatose discreta (44,8% - 13/29) e moderada (60,9% - 14/23). Ela foi também presente em 55% dos casos (11/20) em que não havia atividade inflamatória lobular e em 62% dos casos (31/50) de EENA. Mesmo tendo patogêneses diferentes (Burt et al, 1998), ambos os tipos de esteatose podem ocorrer desde o início da DHGNA, podendo representar fases diferentes de uma mesma lesão, já que ambas mostram alguma forma de lesão mitocondrial.

Com relação à utilização dos graus de esteatose na graduação da EENA, concordamos com Mendler et al (2005) quando eles excluem a ocorrência de

esteatose do seu *score*, afirmando que ela é usada somente para se estabelecer o diagnóstico de DHGNA e que sua intensidade não se correlaciona com o grau da esteatoepatite e conseqüente gravidade da doença. Brunt et al (1999) definem que na EENA discreta (grau 1) a esteatose pode ser no máximo de intensidade moderada (até 66% dos hepatócitos da amostra) e que na EENA acentuada (grau 3) a esteatose acomete tipicamente mais de 66% dos hepatócitos da amostra. Encontramos 12 casos de EENA discreta (grau 1) com esteatose acentuada. Além disso, um caso de EENA acentuada (grau 3) apresentava esteatose discreta. Assim sendo, 13/50 casos (26%) não se encaixam na classificação de Brunt et al (1999), se levarmos em consideração a quantificação da esteatose na graduação final da EENA. Vale ressaltar que a esteatose parece ser inversamente proporcional à gravidade da doença, ou seja, quanto mais intensa a esteatoepatite, menor a quantidade de esteatose (Mendler et al, 2005). Tal fenômeno tem também sido documentado em casos de cirrose atribuídos a EENA (Bugianesi et al, 2002). Portanto, a intensidade da esteatose não prediz prognóstico e não deve interferir na graduação da EENA.

A balonização hepatocitária esteve presente em 100% das amostras. Na literatura ela variou entre 34,9% (Gramlich et al, 2004) e 83,3% (Dixon et al, 2001) dos casos. O encontro de apenas balonização não faz o diagnóstico de EENA. Essa alteração é uma manifestação morfológica do dano celular e aparece em resposta aos mais variados insultos, sendo portanto inespecífica. Neste estudo ela foi também identificada nos casos em que a esteatose era a única lesão, o que reforça sua importância como lesão básica da DHGNA, não apenas relacionada à EENA. Igualmente a Brunt et al (1999), neste trabalho a balonização foi dividida em ocasional e freqüente. Durante a realização da pesquisa houve sempre grande dificuldade em graduá-la, sendo esta subclassificação extremamente subjetiva. Isso se deve ao fato de não existir um número de hepatócitos balonizados definido como sendo de quantidade ocasional ou freqüente. Como os critérios mínimos de EENA incluem a balonização (Burt et al, 1998; Brunt, 2001; Brunt 2004) bastaria verificar se ela está presente, sem quantificá-la. A balonização acompanhou a distribuição zonal da esteatose, sendo 61,4% dos casos distribuídos nas três

zonas e 35,7% na zonas 2 e 3, sugerindo que as lesões tenham alguma relação entre si. Caldwell et al (2006) evidenciaram à microscopia eletrônica hepatócitos aumentados de volume (que à microscopia óptica correspondiam a células balonizadas) contendo gotículas de lipídeo que podiam se fundir, levando à formação de macrovacúolos. Eles sugerem que o citoplasma rarefeito visto como balonização à microscopia óptica representa o acúmulo de gotículas lipídicas (esteatose microvacuolar). Uma avaliação crítica deste trabalho deve ser feita, tendo em vista já estar bem definido na literatura o conceito de degeneração hidrópica, sendo a balonização a representação extrema do acúmulo de água no citoplasma e organelas. A esteatose microvacuolar se refere ao acúmulo de lipídeos e é representada por pequenos vacúolos citoplasmáticos, sendo resultante de dano mitocondrial. Do ponto de vista da microscopia óptica elas constituem lesões morfológicamente distintas.

A inflamação nos tratos portais (34/70 - 48,6%) foi menos freqüente que a relatada pela literatura (83% citados por Brunt, 2004 e 90% citados por Diehl et al, 1988). Predominou o tipo de infiltrado inflamatório composto por mononucleares. A intensidade da inflamação portal foi discreta em 31 (44,3%) e moderada apenas em 3 (4,3%) biópsias, corroborando Brunt et al (1999). Os casos estudados reforçam o conceito de que a inflamação portal não é um componente importante na DHGNA e na EENA e que casos que mostram inflamação portal exuberante devem levantar a possibilidade da ocorrência de outras doenças associadas. Deste modo, o aspecto histológico encontrado nas biópsias mais uma vez corrobora a validade dos critérios de exclusão utilizados.

Nos trabalhos publicados a taxa de atividade inflamatória lobular na DHGNA variou de 25% (Dixon et al, 2001) a 97% (Diehl et al, 1988), estando o valor de 71,4% (50/70) dentro da faixa relatada. O achado de atividade inflamatória lobular de intensidade discreta (grau 1) em 61,4% (43/70) das biópsias reforça o conceito de que a maioria dos casos de EENA mostra inflamação discreta (Brunt, 2001). A metodologia de avaliação da inflamação como descrita por Brunt et al (1999) foi o único parâmetro utilizado nesta pesquisa para graduar a EENA: inflamação quantificada como discreta corresponde a EENA

discreta e assim por diante. Outras lesões hepatocitárias tais como a esteatose macrovacuolar e a balonização são fundamentais para o diagnóstico de EENA, mas podem aparecer em intensidades variáveis nas biópsias. Assim sendo, a presença destas lesões seria obrigatória, mas sua quantificação não influenciaria na graduação da EENA. Esta forma de quantificar a atividade inflamatória lobular é objetiva e de aplicação segura.

A ocorrência de lipogranulomas em casos de DHGNA tem sido bem variada na literatura, com valores que vão desde 1% (Silverman et al, 1990) até 82,3% (Brunt et al, 1999). A taxa aqui encontrada de 35,7% está de acordo com esses relatos. Brunt et al (1999) não encontraram qualquer relação aparente entre a ocorrência de lipogranulomas e outros indicadores de grau histológico. Não há evidências de que os lipogranulomas contribuam para a progressão da fibrose (MacSween & Burt, 1986). Portanto, sua presença não foi considerada como indicadora de atividade inflamatória.

Hialinos de Mallory (presentes em 10/70 - 14,3%) ocorreram com frequência dentro dos valores relatados na literatura: eles variaram de 9 (Powell et al, 1990) a 90% (Diehl et al, 1988). Os casos que apresentavam a maior quantidade de hialinos de Mallory eram aqueles que mostravam hepatócitos com balonização acentuada, fato que facilitava sua identificação. Provavelmente a ocorrência de hialinos de Mallory indique realmente estágio mais avançado da doença, conforme sugerido por Matteoni et al (1999), pois eles não foram identificados em casos que mostraram apenas esteatose e em todos os casos em que foram observados existia fibrose de algum grau. O achado de hialinos de Mallory em apenas 14,3% dos casos reforça o conceito de que eles não são considerados fundamentais ao diagnóstico da EENA (Brunt, 2001; Brunt 2004). Se eles fossem essenciais apenas diagnósticos tardios seriam efetuados.

A apoptose de hepatócitos esteve presente em 17/70 (24,3%) casos. Na literatura o achado de apoptose variou de três (Gramlich et al, 2004) a 40% (Brunt et al, 2004). Por não evocar resposta inflamatória, a morte celular por apoptose não tem valor na graduação da DHGNA. É um achado que pode estar presente, não sendo fundamental ao diagnóstico (Brunt, 2001; Brunt, 2004).

Os núcleos glicogenados foram identificados em quase metade das biopsias (47,1%). Silverman et al (1990) encontraram núcleos glicogenados em 66% de seus casos, porém todos os pacientes eram obesos e 54% apresentavam DM/RI, sendo essas alterações bem mais freqüentes que nesta amostra (53,2% de pacientes obesos e 26,6% de pacientes com DM/RI). A importância de sua identificação reside no fato de que eles são muito mais comuns na DHGNA do que na hepatite alcoólica (Hübscher, 2004). Brunt (2001) relata a presença dos núcleos glicogenados na zona 1 do ácino. Nesta pesquisa eles também foram identificados nas zonas 2 e 3 em 9/70 (27,3%) casos. Portanto, eles são mais freqüentes na zona 1, embora não sejam exclusivos dela. O conteúdo de glicogênio hepático varia com a dieta e o período pós-prandial. Após uma refeição rica em carboidratos, o glicogênio é depositado primeiramente na zona 1 e depois vai sendo depositado nas demais. Após o término da absorção o glicogênio é em parte removido, primeiramente da zona 3 (Lima, 2004). Isso explicaria o predomínio dos núcleos glicogenados na zona 1 e mostra que é possível encontrá-lo também nas outras zonas. Os núcleos glicogenados foram descritos como mais freqüentes em pacientes diabéticos por Silverman et al (1990). Eles encontraram tal alteração histológica em 60,9% dos pacientes sem DM/RI, em 56,5% dos intolerantes à glicose e em 80,6% dos pacientes diabéticos tipo 2. A relação entre núcleos glicogenados e DM/RI não foi estatisticamente significativa nesta amostra. Mesmo assim, os núcleos glicogenados foram descritos em 7 (58,3%) pacientes diabéticos/resistentes à insulina e em 14 (42,4%) não diabéticos/ resistentes à insulina. Provavelmente o pequeno número de pacientes com DM/RI (apenas 12) contribuiu para que o teste não fosse estatisticamente significativo.

O acúmulo de ferro nos hepatócitos não foi freqüente e quando presente foi graduado como siderose grau 1 (14 casos) ou 2 (2 casos). Bacon et al (1994) e Adams et al (2005) não encontraram depósitos hepatocelulares de ferro superiores ao grau 2. Resultados semelhantes foram descritos por Brunt et al (2004) como pode ser visto na tabela 13, porém eles observaram siderose mais frequentemente em hepatócitos do que em células de Kupffer, ao contrário de

nossas observações. Freqüente foi o acúmulo de lipofuscina (64,3%), pigmento acastanhado referente a desgaste celular e que pode ser confundido com ferro ao HE.

Acúmulo de ferro	Amostra atual (%)	Brunt et al (2004) (%)
Ausente	62,9	46,7
Hepatócitos	5,7	30
Células de Kupffer	8,6	3,3
Hepatócitos e células de Kupffer	17,1	20

Tabela 13: Comparação entre a deposição de ferro entre a amostra deste trabalho e Brunt et al (2004).

Nesta pesquisa, quando presente, a fibrose de intensidade discreta (estágio 1) foi a mais freqüente (12/70 - 17,1%). Na literatura ela variou de 18% (Adams et al, 2005) a 38,7% dos casos (Lee, 1989). A cirrose, neste estudo, foi pouco comum (2/70 - 2,9%); na literatura este relato variou de 0 (Brunt, 2004) a 26% (Diehl et al, 1989). A maioria dos casos foi estadiada como 1, ou seja, predominou a fibrose perivenular, justamente onde se concentram a esteatose e a balonização. Isso reforça a teoria de que a fibrose surge em consequência dos insultos que ocorrem nesta área. A fibrose tende a ter evolução lenta (Adams et al, 2005), o que favorece também o achado de maior número de casos com fibrose estágio 1.

A coloração pelo picrosírius revelou a mesma intensidade de fibrose observada com o tricrômico de Masson/Gomori em todos os casos. Assim sendo, estas últimas colorações são apropriadas para serem utilizadas rotineiramente no estudo da DHGNA, pois não subestimam a fibrose conforme sugeriu Brunt (2004).

Com referência à fibrose algumas modificações foram feitas em relação aos conceitos propostos por Brunt et al (1999). Em seu estadiamento eles incluem na mesma categoria alterações focais ou extensas, portanto uma biópsia com fibrose septal focal teria o mesmo estadiamento de uma biópsia com fibrose septal extensa. Brunt et al (1999) e Brunt (2001) relatam que uma das características da

EENA é seu padrão de fibrose na zona 3, que é típico. No entanto, no estadiamento ela considera como estágio 2 aquelas biópsias que mostram fibrose na zona 1 (periportal) focal ou extensa, sem levar em conta a formação de septos na zona 3. Por isso optou-se por modificar o estadiamento original de Brunt et al (1999) e adotou-se o descrito no protocolo 2.

A classificação para EENA proposta por Brunt et al (1999) foi neste trabalho a escolhida por ser a mais completa e a mais difundida classificação internacionalmente utilizada. O sistema de categorização tal como descrito pelo grupo de Cleveland nos artigos originais de Younossi et al (1998) e Matteoni et al (1999) não foi utilizado porque não deixa claro se a inflamação está presente na categoria 3 (esteatonecrose: esteatose + balonização). Além disso, diferentes interpretações sobre quais categorias correspondem a EENA foram observadas: Siqueira et al (2005), Cotrim et al (2004), Falck-Ytter et al (2001) e Youssef & McCullough (2002), ao utilizarem o sistema de categorização de Younossi et al (1998) e Matteoni et al (1999), consideraram apenas os grupos 3 e 4 como EENA em seus trabalhos. Já Contos & Sanyal (2002), ao discutirem a referida categorização, consideraram como representativas de EENA as categorias de 2 a 4. Neste trabalho a classificação histológica de Brunt et al (1999) foi utilizada porque particulariza diversas variáveis histológicas e propõe uma forma semi-quantitativa de avaliação da atividade inflamatória lobular, considerando principalmente o fenótipo da célula inflamatória (polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos e eosinófilos). Desta forma pode-se graduar a EENA nas suas formas mais brandas, gerando diagnósticos mais precoces e mais fidedignos.

Não foram encontradas relações estatisticamente significativas entre os componentes da Síndrome metabólica e a presença das três principais variáveis histológicas (esteatose macrovacuolar, atividade inflamatória lobular e fibrose). Esse achado pode refletir a dificuldade vivenciada para se obter as informações referentes à clínica do paciente, pois o número de casos em cada uma das condições clínicas foi menor que 70. Foi baixo o número de indivíduos com as alterações da Síndrome metabólica: 12 com DM/RI, 19 com HAS, 27 com hipercolesterolemia, 25 obesos, 22 com baixos níveis de HDL e 26 com

hipertrigliceridemia. A dificuldade na obtenção das informações clínico-laboratoriais comprometeu a análise estatística, por reduzir em demasia a amostra. A grande variabilidade de resultados descrita na literatura (vide revisão bibliográfica) mostra que estas associações são altamente dependentes da amostra (tanto do seu tamanho como de suas características). Além disso, o diagnóstico de EENA por parte do patologista só pode ser feito se ele recebe do clínico a informação de que o paciente não é etilista e/ou é portador de algum dos componentes da Síndrome metabólica.

Níveis elevados de ALT mostraram relação estatisticamente significativa com a presença de inflamação lobular, confirmando os achados de Marchesini et al (2001). Este achado não estabelece qualquer relação de causa ou efeito, mas sugere que ambos não ocorreram juntos devido ao acaso. Vários outros trabalhos relatam não haver associação entre a elevação das transaminases e o grau de atividade inflamatória, ou seja, valores pouco elevados podem ocorrer com atividade inflamatória mais intensa e vice-versa (Lee, 1989; Brunt et al, 2004; Mendler et al, 2005).

Houve também relação estatisticamente significativa das três variáveis histológicas entre si, em concordância com Ratziu et al (2000) e George et al (1998). Esse achado sugere que as três variáveis estão de alguma forma relacionadas, mas não estabelece quem é causa e quem é efeito. Vale frisar mais uma vez que tal associação foi encontrada entre esteatose moderada e acentuada e a presença de inflamação e fibrose e destas duas últimas entre si. Angulo et al (1999) não encontraram relação estatisticamente significativa entre o grau de esteatose, o de inflamação e o estágio da fibrose. No presente estudo as variáveis foram analisadas como categóricas e não como ordinais como descrito por Angulo et al (1999). Como o número de casos graves era muito pequeno, não foi possível fazer a análise ordinal. Somente no estudo da variação interobservador os diferentes graus e estágios foram levados em consideração.

O teste Kappa ponderado mostrou excelentes resultados com concordância muito boa para esteatose macrovacuolar ($K_w=0,82$), boa para atividade inflamatória lobular ($K_w= 0,68$) e para fibrose ($K_w=0,73$). De forma semelhante à

literatura a inflamação foi a variável que mostrou a maior discordância (Younossi et al, 1998; Mendler et al, 2005; Kleiner et al, 2005). Os resultados de Kappa desta pesquisa foram, em sua maioria, melhores (ou seja, exibiram maior concordância) que os relatados na literatura. Tal observação pode ser explicada pelo fato de que os dois patologistas envolvidos na análise das lâminas trabalham juntos e estão constantemente envolvidos em discussões clínico-patológicas.

Uma crítica poderia ser então feita: sendo a atividade inflamatória lobular a variável com menor taxa de concordância, poderia ela ser utilizada como o principal parâmetro para definição do grau da EENA? Nesta pesquisa observou-se que patologistas bem treinados conseguem concordância em 68% dos casos. Classificações de doenças em outros órgãos se baseiam em sistemas que mostram teste Kappa com moderada concordância: o sistema de Gleason é o mais utilizado para graduar o câncer de próstata, o qual tem kappa variando de 0,47 a 0,64 (Allsbrook et al, 2001). Mesmo assim, ele é amplamente utilizado. Acreditamos portanto que, da mesma forma que na próstata, a graduação da EENA pode ser feita com relativa segurança por patologistas treinados.

CONCLUSÕES

Os resultados discutidos neste trabalho permitem concluir que:

- A DHGNA consiste em um espectro de lesões (esteatose, EENA, fibrose/cirrose), das quais a EENA de intensidade discreta (grau 1) constitui a maioria dos casos. Portanto, alterações brandas são encontradas na maior parte das biópsias.
- Para a graduação da EENA o componente determinante do grau foi a atividade inflamatória lobular, composta por infiltrado inflamatório misto que contém, além de linfócitos, principalmente neutrófilos, quantificada conforme a classificação descrita por Brunt et al (1999).
- É de suma importância que o sistema de graduação da EENA valorize os critérios mínimos para que se possa fazer o diagnóstico, sendo eles: existência de esteatose macrovacuolar, de balonização e de focos de atividade inflamatória lobular. A classificação de Brunt et al (1999) atende a esses critérios.
- Quando há fibrose na EENA, ela é geralmente discreta (estágio 1).
- Existindo fibrose, intensidades crescentes de deposição de colágeno a partir da zona 3, com formação de septos, determinam o estágios 2 e 3.
- A classificação de Brunt et al (1999), inicialmente desenvolvida para EENA e utilizada neste trabalho com algumas modificações (utilização apenas da atividade inflamatória lobular na graduação da intensidade da esteatoepatite, sem valorizar a quantidade de esteatose e de balonização e alterações no estadiamento da fibrose) pode ser usada não apenas para o diagnóstico de EENA, mas também da DHGNA como um todo.
- A classificação de Brunt (1999), com as modificações introduzidas neste trabalho, pode ser usada com facilidade na prática diária do patologista e se presta ao diagnóstico das formas brandas da EENA, mostrando concordância interobservador muito boa para esteatose macrovacuolar e boa para a atividade inflamatória e para o estadiamento da fibrose.

- Para que seja feito o diagnóstico de DHGNA em qualquer uma de suas formas de apresentação é indispensável comunicação entre clínico e patologista. É imprescindível que as solicitações de pedidos anátomo-patológicos sejam preenchidas com o maior número possível de informes clínico-laboratoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, LA; Lymp, JF; Sauver, JST et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterol* 2005; 129: 113-21.
- Adams, LA; Talwalkar, JA. Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: S34-S38.
- Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH et al. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists. *Hum Pathol* 2001; 32: 74-80.
- Altman, DG. *Practical Statistics for medical research*. 1991, Chapman & Hall, London, UK.
- Angulo, P. Non alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-31.
- Angulo, P; Keach, JC, Batts, KP, et al. Independent predictors of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-62.
- Bacon, BR; Farahvash, MJ; Janney, CG et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterol* 1994; 107: 1103-9.
- Brunt, EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 3-16.
- Brunt, EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24:3-20.
- Brunt, EM; Janney, CG; Bisceglie, AMD et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-74.
- Brunt, EM; Neuschwander-Tetri, BA; Oliver, D et al. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens. *Hum Pathol* 2004; 35: 1070-82.

- Bugianesi, E; Leone, N; Vanni, E et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2002; 123: 134-40.
- Burt, AD; Mutton, A; Day, CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15: 246-58.
- Caldwell, SH; Redick, JA; Chang, CY et al. Enlarged hepatocytes in NAFLD examined with osmium fixation: does microsteatosis underlie cellular ballooning in NASH? *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1677-8.
- Clark, JM; Brancati, FL; Diehl, AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol* 2002; 122: 1649-57.
- Clark, JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: Supp.1: S5-S10.
- Contos, MJ, Sanyal, AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 37- 51.
- Cotrim, HP; De Freitas, LAR; Freitas, C et al. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. *Liver Int* 2004; 24: 131-5.
- Crawford, AR; Lin, X; Crawford, JM. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatol* 1998; 28: 323-31.
- Cross, EM; Chaffin, WW. Use of the binomial theorem in interpreting results of multiple tests of significance. *Educ Psychol Measure* 1982; 42: 25-34.
- Day, CP; James, OFW. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterol* 1998; 114: 842-4.
- Diehl, AM; Goodman, Z, Ishak, KG. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterol* 1988; 95: 1056-62.
- Dixon, JB; Bhathal, PS; O'Brien, PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterol* 2001; 121: 91-100.
- Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of

high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 2001; 285: 2486- 97.

- Falck-Ytter, Y; Younossi, ZM; Marchesini, G et al. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin liver dis* 2001; 21: 17-26.
- Fasio, E. Álvarez, E; Domínguez, N et al. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004; 40: 820-6.
- Franzén, LE; Ekstedt, M; Kechagias, S et al. Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Mod Pathol* 2005; 18: 912-6.
- Franzese, A; Vajro, P; Argenziano, A et al. Liver involvement in obese children: ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1428-32.
- George, DK; Goldwurm, S; MacDonald, GA et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterol* 1998; 114: 311-8.
- Gramlich, T; Kleiner, DE; McCullough, AJ et al. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2004; 35: 196-9.
- Hill, JO; Wyatt, HR; Reed, GW et al. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science* 2003; 299: 853-5.
- Hübscher, SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathol* 2006; 49: 450-65.
- Hübscher, SG. Role of liver biopsy in the assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1107-15.
- Hui, JM; Kench, JG; Chitturi, S et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:420-7.
- Jakobsson, U; Westergren, A. Statistical methods for assessing agreement for ordinal data. *Scand J Caring Sci* 2005; 19: 427-31.

- Joseph, AE; Saverymuttu, SH; al-Sam, S et al. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol* 1991; 43: 26-31.
- Liou, I; Kowdley, KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: S11-S16.
- Kang, H; Greenson, JK; Omo, JT et al. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2247-53.
- Kleiner, DE; Brunt, EM; Natta, MV et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005, 41: 1313-21.
- Lee, RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20: 594-8.
- Lee, RG. General principles. In: Lee, RG. *Diagnostic liver pathology*. St. Louis, MO: Mosby-year Book, 1994: 1-21.
- Lima, MLRP. *Histologia hepática na obesidade mórbida por ocasião do bypass gástrico*. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- Ludwig, J; Viggiano, TR; McGill, DB et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.
- MacSween, RNM; Burt, AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Sem Liver Dis* 1986; 6: 221-32.
- Marceau, P; Biron, S; Hould, FS et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1513-7.
- Marchesini, G; Brizi, M; Bianchi, G et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-50.
- Matteoni, CA; Younossi, ZM; Gramlich, T et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-9.

- McCullough, AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 255-62.
- Mendler, MH; Kanel, G; Govindarajan, S. Proposal for a histological grading system for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25: 294-304.
- Mofrad, P; Contos, MJ; Haque, M et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; 37: 1286-92.
- Neuschwander-Tetri, BA; Caldwell, SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.
- Powell, EE; Cooksley, WGE; Hanson, R et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of 42 patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 21: 74-80.
- Ratziu, V; Charlotte, F; Heurtier, A et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol* 2005; 128: 1898-906.
- Ratziu, V; Giral, P; Charlotte, F et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterol* 2000; 118: 1117-23.
- Sanyal, AJ. AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol* 2002; 123: 1705-25.
- Searle, J; Kerr, JFR; Halliday, JW. Iron Storage Disease. In: MacSween, RNM; Anthony, PP; Scheuer, PJ et al. *Pathology of the liver*. 3^a Ed. Londres: Churchill Livingstone. 1994: 219-41.
- Shimada, M; Hashimoto, E; Taniai, M et al. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatology* 2002; 37: 154-60.
- Silverman, JF; O'Brien, KF; Long, S et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1349-55.
- Sim, J; Wright, CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther* 2005; 85: 257-68.
- Siqueira, ACG; Cotrim, HP; Rocha, R et al. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatology* 2005; 17: 837-41.

- Soares, JF; Siqueira, AL. Introdução à estatística médica. Coopmed Editora Médica. 2ed. 2002.
- Sorrentino, P; Tarantino, G; Conca, P et al. Silent non-alcoholic fatty liver disease – a clinical histological study. *J Hepatol* 2004; 41: 751-7.
- Teli, MR; James, OFW; Burt, AD et al. The natural history on nonalcoholic fatty liver disease: a follow-up study. *Hepatol* 1995; 22: 1714-9.
- Tominaga, K; Kurata, JH; Chen, YK et al. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity: an epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 200-29.
- Wanless, IR; Shiota, K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 99-106.
- Yoshioka, Y; Hashimoto, E; Yatsuji, S et al. Nonalcoholic steatohepatitis: cirrosis, hepatocellular carcinoma, and burnt-out NASH. *Gastroenterol* 2004; 39: 1215-8.
- Younossi, ZM; Diehl, AM; Ong, JP. Nonalcoholic fatty liver disease; an agenda for clinical research. *Hepatol* 2002; 35: 746-52.
- Younossi, ZM; Gramlich, T; Liu, YC et al. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol*, 1998; 11: 560-65.
- Youssef, WI, McCullough, AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Prac Research Clin Gastroenterol* 2002; 16: 733-47.
- Zafrani, ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004; 444: 3-12.
- Zen, Y; Katayanagi, K; Tsuneyama, K et al. Hepatocellular carcinoma arising in non-alcoholic steatohepatitis. *Pathol Int* 2001; 51: 127-31.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de avaliação histopatológica para DHGNA/EENA

Nome: _____

Biopsia _____ Sexo: |__|F |__|M Idade: |__| anos

1. ESPECIFICAÇÃO DA BIÓPSIA

Cunha (1)	Tamanho Biopsia ____ cm	Nº tratos portais ____
Agulha (2)	Nº Fragmentos ____	Nº veias centrais ____

2. ESTEATOSE (macrovacuolar)

Intensidade				Localização	
(0) ausente	(1) até 33%	(2) 33% a 66%	(3) > 66%	(1) zona 1	(2) zonas 2 e 3

3. ESTEATOSE (microvacuolar)

Intensidade		Localização	
(0) ausente	(1) presente	(1) zona 1	(2) zonas 2 e 3

4. BALONIZAÇÃO HEPATOCELULAR

Intensidade			Localização	
(0) ausente	(1) ocasional	(2) freqüente	(1) zona 1	(2) zonas 2 e 3

5. INFLAMAÇÃO LOBULAR - focos inflamatórios 20 X 20

Intensidade				Fenótipo celular			
(0) ausente	(1) 1-2 foc.	(2) 3-4 foc.	(3) + 4 foc.	(1) mono.	(2) granulo.	(3) misto	() lipogran.

6. INFLAMAÇÃO DO TRATO PORTAL

Intensidade				Fenótipo celular		
(0) ausente	(1) discreta	(2) moderada	(3) acentuada	(1) mononuclear	(2) granulocitário	(3) misto

7. HIALINO DE MALLORY

(0) ausente	(1) presente
-------------	--------------

8. APOPTOSE

(0) ausente	(1) presente
-------------	--------------

9. INCLUSÃO NUCLEAR DE GLICOGENIO

Intensidade			Localização	
(0) ausente	(1) ocasional	(2) freqüente	(1) zona 1	(2) zonas 2 e 3

10. PIGMENTOS

Lipofuscina zona 3		Ferro (Pearls)			
(0) ausente	(1) presente	(0) ausente	(1) hepatócito	(2) Kupffer	(3) ambos

11. FIBROSE

PERI-SINUSOIDAL/PERI-VENULAR (zona 3)

(0) ausente	(1) até 33%	(2) 33% a 66%	(3) >66%
-------------	-------------	---------------	----------

PORTAL

(0) ausente	(1) expansão do trato portal	(2) fibrose peri-portal
-------------	------------------------------	-------------------------

SEPTAL

(0) ausente	(1) raros septos	(2) diversos sem nodularidade	(3) cirrose
-------------	------------------	-------------------------------	-------------

Estágio 0 – ausência de fibrose.

Estágio 1 – arquitetura lobular preservada, com fibrose limitada a área perivenular (zona 3)

Estágio 2 – arquitetura lobular preservada, com fibrose perivenular e poucos septos esparsos.

Estágio 3 – arquitetura lobular alterada, com septos unindo estruturas entre si, com esboço de nódulos.

Estágio 4 - cirrose.

12. CONCLUSÃO

Esteatose: Grau _____

Atividade necro-inflamatória: Grau _____

Estadiamento: Estádio _____

ANEXO 2

PROTOCOLO CLÍNICO DO ESTUDO SOBRE NAFLD/EENA

1. IDENTIFICAÇÃO CASO Nº _____

Nome: _____

Idade|_|_| (anos) Sexo: |_| M |_| F Data da biopsia: _____

Médico: _____

2. HISTÓRIA CLÍNICA

MOTIVO DA CONSULTA:

PESO _____ kg

ALTURA _____ m

IMC _____ kg/m²

Obesidade: SIM _____ NÃO _____

Etilista: SIM _____ NAO _____ Não pesquisado _____

Doenças associadas: (Faça um X nos ítems positivos)

Hipertensão |_|

Diabetes |_|

Hipercolesterolemia |_|

3. EXAMES COMPLEMENTARES

Bilirrubina total _____ Direta _____ Indireta _____

TGO _____ TGP _____ GGT _____

TGO _____ TGP _____ GGT _____

HbsAg: SIM _____ NÃO _____ Não pesquisado _____

Virus C: SIM _____ NÃO _____ Não pesquisado _____

Auto anticorpos SIM _____ NAO _____ Não pesquisado _____

Uso de drogas hepatotóxicas SIM _____ NÃO _____ Qual? _____

Glicose _____

Colesterol total _____ HDL _____ LDL _____ VLDL _____

Triglicérides _____

Ultra-som abdominal:

ANEXO 3 – Aprovação do COEP

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 534/04

Interessada: Dra. Virgínia Hora Rios Leite
Faculdade de Medicina/UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 09 de março de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Doença esteatótica não alcoólica do fígado: avaliação histopatológica em biópsias hepáticas e correlação anátomo-clínica** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

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


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

ARTIGO ENVIADO À REVISTA MODERN PATHOLOGY

Nonalcoholic fatty liver disease – histopathological evaluation in 70 needle biopsies and interobserver agreement

Berenstein, CK; Cardoso, CG; Toppa, NH; Leite, VHR

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises a spectrum of lesions ranging from steatosis, steatohepatitis and cirrhosis to hepatocellular carcinoma, with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) being the progressive form of NAFLD. NAFLD is suspected in the case of hepatomegaly upon clinical examination, fat accumulation in the liver on abdominal ultrasound and/or discrete (2 to 3 times the reference value) and persistently elevated (two or more occasions) aminotransferase levels in individuals presenting no other cause of these alterations (exclusion of other liver diseases). However, these work-up methods only suggest the diagnosis. Liver biopsy is the gold standard for the diagnosis of the disease and is the only method able to differentiate NASH from simple steatosis, to grade inflammation and to stage fibrosis. Herein, we analyzed the histopathological findings of liver biopsies and interobserver agreement in the histological evaluation of cases with a histological diagnosis of steatosis or steatohepatitis, with or without fibrosis and with no history of alcohol abuse in the exam request, with emphasis on the establishment of minimal criteria for the diagnosis of NASH. Seventy needle biopsies were analyzed according to Brunt et al (1999), with modifications, and clinical data of the patients were collected. Discrete NASH (grade 1) was the most common form. If fibrosis was detected, stage 1 was the most frequent. Only two cases of cirrhosis were identified. Interobserver agreement was very good for macrovesicular steatosis ($K_w = 0,82$) and good for lobular inflammation ($K_w = 0,68$) and fibrosis ($K_w = 0,73$). The classification of Brunt et al (1999), with the modifications introduced here, can be applied to the diagnosis not only of NASH but also of NAFLD, representing a reliable method for use in the daily practice of pathologists.

Keywords: nonalcoholic steatohepatitis, nonalcoholic fatty liver disease, steatosis, liver.

Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be the most common liver disease in the United States and has been related to insulin resistance and metabolic syndrome. NAFLD comprises a spectrum of lesions ranging from steatosis, steatohepatitis and cirrhosis to hepatocellular carcinoma (1-4). Ludwig et al (5) were the first to describe nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which is currently considered to be the progressive form of NAFLD.

NAFLD is suspected when clinical examination demonstrates hepatomegaly and/or abdominal ultrasound suggests fat accumulation in the liver and/or in the presence of discrete (2 to 3 times the reference value) and persistently elevated (two or more occasions) aminotransferase levels in individuals presenting no other cause of these alterations (exclusion of other liver diseases) (6). However, these work-up methods only suggest the diagnosis, since NAFLD may also occur in patients with normal aminotransferase levels (7). Liver biopsy is considered to be the gold-standard for the diagnosis of NAFLD and is the only method able to differentiate NASH from simple steatosis, to grade inflammation and to stage fibrosis (8).

Histopathological classification systems have been proposed by Matteoni et al (9) for NAFLD and by Brunt et al (3,4) for NASH. However, few studies evaluating inter- and intraobserver variation in the analysis of NAFLD are available. Younossi et al (8) used the system of Matteoni et al (9) and calculated inter- and intraobserver variation. Moderate interobserver agreement was observed for steatosis grade, location of steatosis, fibrosis stage, hepatocyte ballooning and glycogenated nuclei. Intraobserver agreement was better than interobserver agreement. Inflammation presented poor agreement between pathologists. Mendler et al (10), also proposing a scoring and grading system for NAFLD, found that intraobserver agreement was better than interobserver agreement, indicating that pathologists agree more with themselves than with others. In 2005, Kleiner et al (11) published a report on a histological scoring system for NAFLD which was the first and only study evaluating interobserver variation using the parameters of Brunt et al (3). Again, inflammation showed poor interobserver agreement.

In the present study, we describe the histopathological findings of liver needle biopsies and determine interobserver agreement in the histological evaluation of cases with

a histological diagnosis of steatosis or steatohepatitis, with or without fibrosis and with no history of alcohol abuse in the exam request, with emphasis on the establishment of minimal criteria for the diagnosis of NASH using the classification proposed by Brunt et al (3,4), with modifications. This approach was expected to provide good interobserver agreement that would permit its safe application in the daily practice of pathologists.

Materials and methods

In a retrospective study, needle biopsies of the liver sent to the Analys Laboratory between 1999 and 2006 with a histological diagnosis of steatosis or steatohepatitis of any grade, with or without fibrosis, were analyzed. Cases whose exam request did not report abusive alcohol use (more than 20 g/day) or positive serology for virus B and/or C were selected. Clinically, these patients presented elevated aminotransferase levels and/or alterations upon abdominal ultrasound that justified a liver biopsy. A total of 200 cases with these features were identified.

After detailed analysis of the records of each subject, 89 cases were excluded due to the following reasons: sample belonging to a transplanted liver [n = 10, with the primary causes of liver transplantation being autoimmune hepatitis (n = 1), secondary biliary cirrhosis (n = 1), alcoholism (n = 1), alcoholism and nonspecified virus (n = 1), and liver disease due to virus C (n = 6)], heterozygous hemochromatosis (n = 5), alcoholism (n = 35), presence of autoantibodies (n = 4), alcoholism and C virus infection (n = 2), hepatitis associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use (n = 1), review cases (n = 3), record not found (n = 7), and impossibility to contact the responsible physician (n = 12).

Needle biopsies were considered to be representative if they included at least five portal tracts (12) and five centrilobular veins, since all fundamental lesions including fibrosis preferentially affect zone 3. The presence of steatosis was a basic condition for inclusion and cases with less than 5% of steatotic hepatocytes were defined as normal and were excluded from the study (13). On the basis of these criteria, 40 additional cases were excluded: wedge biopsies (n = 4), biopsies with fewer than five portal tracts (n = 7), biopsies with fewer than five centrilobular veins (n = 21), and a normal liver (n = 8). One biopsy presenting sickle-shaped red blood cells was also excluded.

The remaining 70 samples were submitted to routine processing at the service of origin, including fixation in 10% formalin, dehydration in an increasing ethanol series, xylene clearing, and embedding in paraffin. The specimens were cut with a microtome and the slides were stained with hematoxylin-eosin, Masson/Gomori's trichrome, Perls' stain and picrosirius.

The slides stained with hematoxylin-eosin and Masson/Gomori's trichrome were examined by two experienced pathologists who were unaware of the clinical/laboratory data. A specially prepared protocol was filled out based on the parameters of Brunt et al (3,4,14), with some modifications.

The size of the biopsies was measured in their major axis and, if there was more than one fragment, the values were summed. Steatosis was defined as discrete (up to 33% of hepatocytes affected), moderate (33 to 66%), and marked (more than 66%). Microvesicular steatosis was classified as present or absent and its location in the acinus was recorded. Hepatocyte ballooning and glycogenated nuclei were scored as absent, occasional or frequent and their topography was also recorded. Lobular inflammatory activity was classified as absent, discrete (1 to 2 foci at 20X magnification), moderate (3 to 4 foci at 20X magnification), and marked (more than 4 foci at 20X magnification). The portal inflammatory infiltrate was classified as absent, discrete, moderate or marked, and its cellular phenotype was recorded. The presence of lipogranulomas, Mallory's hyaline and apoptosis was recorded. The presence or absence of hepatic iron was determined and, if present, iron accumulation was graded. The presence of lipofuscin was also evaluated. The intensity of fibrosis was divided into four categories: absent, stage 1 (preserved lobular architecture with fibrosis limited to the perivenular area), stage 2 (preserved lobular architecture, with perivenular fibrosis and few scattered septa), stage 3 (altered lobular architecture with septal bridging and incipient nodule formation), and stage 4 (cirrhosis).

The following data were obtained from the records: weight, height, body mass index (BMI), presence or absence of obesity, alcohol abuse, associated diseases (arterial hypertension, diabetes and/or insulin resistance (DM/IR), and hypercholesterolemia), serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), serology for B and C virus, presence of autoantibodies, use of hepatotoxic drugs, glycemia, total cholesterol, serum high-density lipoprotein (HDL),

serum low-density lipoprotein (LDL), serum very low-density lipoprotein (VLDL), triglycerides, and abdominal ultrasound result.

With respect to metabolic syndrome components, patients with a BMI ≥ 30 or those reported by the physician to be obese but for whom no data regarding weight and/or height were available were classified as obese. Arterial hypertension was defined as a blood pressure higher than 130 x 85 mmHg on two or more occasions or when the patients used antihypertensive drugs. Insulin resistance was diagnosed when impaired fasting glucose was ≥ 110 mg/dl and type 2 diabetes mellitus was defined as fasting glycemia higher than 126 mg/dl. Patients using oral hypoglycemic drugs were also considered to be diabetic. Elevated cholesterol levels were defined as total cholesterol >200 mg/dl and HDL <40 mg/dl for men and <50 mg/dl for women. Hypertriglyceridemia was diagnosed when triglycerides levels were higher than 150 mg/dl. Patients presenting at least three of these features were classified as having metabolic syndrome (15).

ALT, AST and GGT were measured at various laboratories using different reference values. The median reference values cited in the records was used to classify the exams as normal or abnormal, with a median of 40 U/l for ALT and AST and of 45 U/l for GGT. The AST/ALT ratio was calculated for each case.

The results were submitted to descriptive analysis using the SPSS 9.0 statistical program. Interobserver agreement was evaluated using the weighted kappa test (K_w) (16,17) of the Stata 7.0 program. The K_w coefficient was interpreted as follows: <0.2 = low agreement, 0.21 to 0.40 = weak agreement, 0.41 to 0.60 = moderate agreement, 0.61 to 0.80 = good agreement, and >0.80 = very good agreement (17).

Results

Twenty-five (35.7%) of the 70 patients were women. The mean age was 42 years. The clinical and laboratory characteristics of the patients are shown in Table 1. Information regarding the presence of obesity was available for 47 patients. Twenty-five (53.2%) of these patients were obese and 22 (46.8%) were non-obese. Seventeen of the 25 obese patients presented a BMI >30 and in the remaining eight cases only the clinical record of obesity was available (BMI not calculated). Nineteen of the 22 non-obese subjects had a BMI <30 and three were clinically described as non-obese.

Information regarding the glyceemic profile was obtained for 45 patients. Twelve (26.6%) subjects were classified as type 2 diabetic or resistant to insulin. Glycemia values were available for 10 of these patients and in the remaining two cases the physician informed about the presence of DM/IR. Seventeen of the 70 patients presented criteria fulfilling the classification of metabolic syndrome. The AST /ALT ratio was less than one in 59 (84.2%) cases.

Abdominal ultrasound was compatible with discrete steatosis in four patients (5.7%), with moderate steatosis in nine (12.9%), and with marked steatosis in 23 (32.9%). Steatosis was classified as discrete/moderate in two cases (2.9%) and as moderate/marked in seven (10%). Steatosis was not quantified in 21 exams and the liver showed normal characteristics in one patient who clinically presented elevated AST and GGT levels.

The size of the biopsy specimens ranged from 0.9 to 3.6 cm, with a mean of 1.79 cm and a median of 1.8 cm. The number of fragments per case ranged from one to 12. The samples presented a mean of 10.57 portal tracts and of 8.87 centrilobular veins, with a minimum of five portal tracts and five centrilobular veins. These structures were not counted in two cases classified as cirrhosis.

Table 2 summarizes the histological findings. In 46 (65.7%) cases, macrovesicular steatosis was diffusely distributed, i.e., it was present in the three zones of the acinus. When diffuse, moderate and marked steatosis predominated (36/46), but cases of discrete steatosis (10/46) showing a diffuse distribution in the acinus were also observed. Steatosis was restricted to zones 2 and 3 in 22 (31.4%) cases. The topography of steatosis was not determined in two (2.9%) cases classified as cirrhosis.

Microvesicular steatosis was associated with mild steatosis in 13/29 (44.8%) cases, with moderate steatosis in 14/23 (60.9%), and with marked steatosis in 15/18 (83.3%). In addition, microvesicular steatosis was observed in 11/20 (55%) patients who presented no associated lobular inflammatory activity.

Hepatocyte ballooning was found in the three zones in 43 (61.4%) cases and in zones 2 and 3 in 25 (35.7%). The topography of ballooning was not evaluated in two cases classified as cirrhosis.

The portal inflammatory infiltrate consisted of mononuclear cells in 58.8% of biopsies and of mono- and polymorphonuclear neutrophils in 41.2%. Lobular

inflammation, defined as present when the inflammatory focus contained polymorphonuclear neutrophils, was detected in 50 cases (71.4%). The two patients presenting marked activity corresponded to the cases of cirrhosis. No inflammatory foci were identified in 20 samples (28.6%). Lipogranulomas were not considered as indicators of inflammatory activity.

Thirty-one (62%) of the 50 patients classified as having NASH were males. NASH was observed in 68.9% (31/45) of men and 76% (19/25) of women. The following patients presented lobular inflammatory activity: 18 (72%) obese and eight (81.8%) non-obese patients, 11 (57.9%) hypertensive and 34 (75.5%) non-hypertensive patients, six (50%) DM/IR and 27 (81.8%) non-DM/IR patients, 20 (74%) patients with hypercholesterolemia and 17 (65.4%) patients with normal total cholesterol levels, 16 (72.7%) patients with low HDL levels and 17 (68%) patients with HDL levels within normal limits, and 22 (84.6%) patients with hypertriglyceridemia and 20 (55.5%) patients with normal serum triglyceride levels. Only six (35.3%) of the 17 patients with metabolic syndrome presented some degree of fibrosis.

Mallory's hyaline was not detected in cases presenting only steatosis and in all cases they were present there was some degree of fibrosis. Mallory's bodies were frequently detected in extremely ballooning cells.

Glycogenated nuclei were located in zone 1 in 23 (69.7%) samples and in zones 1, 2 and 3 in nine (27.3%). No topographic assessment was performed in one case (3%) of cirrhosis. No significant association was observed between the occurrence of DM/IR and glycogenated nuclei ($X^2 = 0.89$; $P = 0.34$).

Iron accumulation determined with Perls' stain was absent in 44 (62.9%) biopsies. Iron accumulation was detected in the cytoplasm of hepatocytes in four (5.7%) cases, in Kupffer cells in six (8.6%) and in the two cell types in 12 (17.1%). In four cases the material was not sufficient for the investigation of iron. Hepatic siderosis was classified as grade 1 in 14 (87.5%) biopsies and as grade 2 in two (12.5%).

The weighted kappa test showed very good agreement for the diagnosis of macrovesicular steatosis ($K_w = 0.82$) and good agreement for the detection of lobular inflammation ($K_w = 0.68$) and fibrosis ($K_w = 0.73$).

Discussion

A predominance of NASH among women was reported up to the 1990's. However, more recent reports (18,19) have shown a similar frequency of NAFLD and NASH in both genders. In the present investigation, 45 (64.3%) of the patients with NAFLD were men and 31 (62%) of the 50 patients classified as having NASH were also males, confirming the lack of a predominance among women as initially believed. Clark et al (20) observed a higher tendency toward NAFLD among men compared to women in various age groups and raised the possibility that female hormones may play a protective role since the probability of NAFLD was higher among postmenopausal women compared to premenopausal women. In addition, postmenopausal women undergoing hormone replacement therapy presented a lower probability of NAFLD. In the present study, the prevalence of NASH was 76% (19/25) among women and 68.9% (31/45) among men. The mean age at the time of diagnosis of NAFLD was 42 years, an age slightly younger than that reported in the literature (5,9,19-22). However, women were on average almost a decade older (47.2 years) than men (40.4 years) and presented a greater tendency toward inflammation. Thus, the increased tendency toward steatohepatitis in the female gender might be explained by the lack of the protective role of hormones suggested by Clark et al (20).

The prevalence of obese patients was 53.2% (25/47), the prevalence of diabetic patients was 26.6% (12/45) and the prevalence of patients with hypertriglyceridemia was 59.1% (26/44). In the literature, a prevalence of 45 to 95% has been reported for obesity, of 22 to 55% for diabetes and of 67-68% for hypertriglyceridemia (5,9,19-22). Arterial hypertension was diagnosed in 29.7% (19/64) of the present cases, a rate situated between the 15% reported by Ludwig et al (5) and the 36% reported by Adams et al (18). Despite the large number of losses, the rates observed here for diabetes, obesity and systemic arterial hypertension agree with literature data. The same was not observed for hypertriglyceridemia whose prevalence was below reported values. Adams et al (18) observed low serum HDL levels in 33% (117/359) of cases, a percentage lower than that found in the present study which was 46.8% (22/47). However, only 84 cases of the sample of 435 patients were biopsied (18), and no histological confirmation of NAFLD was therefore obtained. Regarding serum total cholesterol, few detailed studies are available.

Ludwig et al (5) observed hypercholesterolemia in 36% of patients with NASH, in contrast to the 51% found in the present study. Matteoni et al (9) showed that patients with NAFLD present on average cholesterol levels above those considered to be acceptable, irrespective of the severity of the disease. In summary, the metabolic syndrome component most frequently associated with NAFLD was hypertriglyceridemia, followed by obesity. DM/IR was the least commonly associated condition, although insulin resistance is considered to be a basic alteration of the disease. Only 17 (24.3%) of the 70 patients met criteria for the classification of metabolic syndrome. This finding shows that NAFLD should be included in the diagnostic hypothesis even in the absence of criteria for metabolic syndrome, since euglycemic and lean patients without dyslipidemias may present some form of NAFLD. Researchers have been warning since 1994 (19) that the group affected by this liver disease is much larger than the group of middle-aged obese women originally described in 1989 (5).

As expected, most patients (59, 84.2%) showed an AST/ALT ratio of less than one. The 11 cases with a ratio >1 were classified histologically as shown in Table 3. Three of the four cases with a ratio higher than 1.4 had at least moderate fibrosis, a finding indicating more severe disease as reported by Falck-Ytter et al (23). Case 64 presented an AST/ALT ratio of 1.6 but only had marked steatosis in the absence of fibrosis or inflammatory activity. Bacon et al (19) reported an AST/ALT ratio > 1 in three patients but only two presented cirrhosis, with no explanation being provided for the altered ratio in the third case. On the basis of the available data, we do not know the reason for the elevated AST/ALT ratio in case 64. The other altered values were close to one and may not reflect a true increase in the AST/ALT ratio.

The classification for NASH proposed by Brunt et al (3) was chosen since it is the first and most widely used international classification system. The classification system described by the Cleveland group in the original articles of Younossi et al (8) and Matteoni et al (9) does not clarify whether inflammation is present in category 3 (steatosis + ballooning). In addition, different interpretations as to which categories correspond to steatohepatitis have been reported. Siqueira et al (24), Cotrim et al (25), Falck-Ytter et al (23) and Youssef & McCullough (26) only considered categories 3 and 4 as NASH,

whereas Contos & Sanyal (27) regarded categories 2 to 4 as representative of steatohepatitis.

Discrete macrovesicular steatosis was the most common alteration (41.4%), followed by the moderate (34.3%) and marked forms (24.3%), with the three categories showing a more or less homogenous distribution. Steatosis was classified as occurring at zones 2 and 3 or all three zones (panacinar). This was done because no clear limits exist between the acinar zones and alterations are invariably observed in zone 2 but at a lower frequency. This distribution is comparable to that reported by other investigators (13,14) who only cited zone 3 as the most affected. In the present study, the distribution was diffuse in more than half the cases (65.7%), with no preference for a specific zone. When diffuse, moderate and marked steatosis predominated (36/46), but a diffuse distribution in the acinus was also observed for cases exhibiting discrete steatosis. Most of the 22 cases (18/22, 81.2%) in which steatosis was restricted to zones 2 and 3 presented discrete steatosis. In the remaining four (18.2%) biopsies steatosis was classified as moderate. Steatosis could not be marked since zones 2 and 3 correspond to only 66% of the acinus.

The association with microvesicular steatosis was highly frequent, being observed in 60% of cases. In the literature, this association ranges from 34.1% (28) to 59% (29). Mendler et al (10) also observed macro- and microvesicular steatosis in most cases. Brunt (14) reported that microvesicular steatosis generally occurs in more severe cases. In the present study, microvesicular steatosis was observed in 83.3% of cases of marked macrovesicular steatosis but was also present in cases of discrete (44.8%) and moderate (60.9%) steatosis. Microvesicular steatosis was also observed in cases of steatosis in the absence of lobular inflammatory activity. Despite a different pathogenesis (30), both types of steatosis seem to be present from the onset of NAFLD.

With respect to the use of steatosis grades in the grading of NASH, we agree with Mendler et al (10) who omitted the steatosis from their score stating that steatosis is only used to establish the diagnosis of NAFLD but is not correlated with the degree of steatohepatitis. Brunt et al (3) defined that in discrete NASH (grade 1) steatosis might be moderate at most and that in marked NASH (grade 3) steatosis predominantly affects more than 66% of hepatocytes. We observed 12 cases of discrete NASH (grade 1) associated with marked steatosis. In addition, one case of marked NASH (grade 3) presented discrete

steatosis. Thus, 13 (18.5%) cases did not meet the classification criteria of Brunt et al (3). Furthermore, several reports have shown that steatosis tends to decrease with progression of the disease (31) and might be absent in advanced cases of cirrhosis. It would thus be a contradiction to say that marked NASH can only occur with severe steatosis.

Hepatocyte ballooning was observed in 100% of the samples. However, the finding of ballooning alone does not indicate a diagnosis of NASH. This alteration is a morphological manifestation of cell damage and occurs in response to the most variable injuries, thus being a nonspecific lesion. In the present study, ballooning was also identified in cases presenting only steatosis, a finding supporting its importance as a basic lesion of NAFLD and not only related to NASH. Ballooning was classified as occasional and frequent, but great difficulties in grading this alteration were encountered during the study since this subclassification is extremely subjective. Since the minimal criteria of NASH include ballooning (4,14,29) the determination of its presence would be sufficient.

The observation of discrete lobular inflammation in 61.4% (43/70) of the samples supports the concept that discrete inflammation is present in most cases of NASH (14). Studies have reported a prevalence of inflammation ranging from 25% (32) to 97% (29), with the rate of 71.4% (50/70) being within the reported range. Lobular inflammation as described by Brunt et al (3) was the only parameter used to grade NASH, with discrete inflammation corresponding to discrete NASH (grade 1) and so on. Steatosis and hepatocyte ballooning are fundamental for the diagnosis of NASH but are present at variable degrees. Thus, the presence of these two parameters is obligatory but their quantification does not influence NASH grading.

Lipogranulomas, Mallory's hyaline, apoptosis or glycogenated nuclei are not considered to be fundamental for the classification of NASH and will not be discussed.

Picrosirius staining revealed the same intensity of fibrosis as observed with Masson/Gomori's trichrome in all cases. Thus, the latter staining method is appropriate for routine use in the study of NAFLD since it does not underestimate fibrosis (4).

Some modifications were introduced in the classification of Brunt et al (3) regarding the staging of fibrosis since this system includes focal and extensive alterations in the same category, with a biopsy showing focal septal fibrosis being classified as the same stage as a biopsy presenting extensive septal fibrosis. One of the characteristics of NASH is its pattern

of fibrosis in zone 3, which is typical (3,14). However, the staging system of Brunt et al (3) classifies cases presenting focal or extensive periportal fibrosis as stage 2, which seems incongruent. We therefore modified the original staging and adopted the system described in the Materials and Methods section.

When present, fibrosis was discrete in most cases (17.1%). A prevalence ranging from 18% (18) to 38.7% (21) has been reported in the literature. Cirrhosis was rare (2.9%), with studies reporting a prevalence of 0 (4) to 26% (29). Most cases were classified as stage 1, i.e., fibrosis predominated in zone 3 (perivenular) where steatosis and ballooning were concentrated. This finding suggests that fibrosis arises as a consequence of injuries that occur in this area. Fibrosis tends to show a slow progression (18), a fact that also explains the finding of a larger number of cases with stage 1 fibrosis.

The weighted kappa test showed excellent results, with very good agreement for the diagnosis of macrovesicular steatosis ($K_w = 0.82$) and good agreement for the diagnosis of lobular inflammation ($K_w = 0.68$) and fibrosis ($K_w = 0.73$). Similar to the literature, inflammation was the variable that showed the largest disagreement (8,10,11). Most of the present results were better than those reported in the literature (8,10,11). This observation might be explained by the fact that the two pathologists analyzing the slides work together and are constantly engaged in clinical-pathological discussions. However, one criticism might be made: if inflammation is the variable showing the lowest agreement, can it be used as the main parameter for the definition of NASH grade? We observed that well-trained pathologists obtained agreement in 68% of cases. The Gleason system, which is the most widely used for grading prostate cancer, shows a kappa index ranging from 0.47 to 0.64 (34). Nevertheless, this system is widely used. We therefore believe that, as done in the prostate, NASH can be graded with relative safety by trained pathologists.

Conclusion

The communication between the clinician and pathologist is essential for the diagnosis of any form of NAFLD, and the anatomopathological requests should contain as many clinical-laboratory data as possible.

NAFLD comprises a spectrum of lesions (steatosis, NASH, fibrosis/cirrhosis), with discrete NASH (grade 1) being present in most cases. The determinant component for the grading of NASH was lobular inflammatory activity, characterized by a mixed inflammatory infiltrate consisting of lymphocytes and mainly neutrophils, which was quantified according to the classification of Brunt et al (3). It is of the utmost importance that a grading system for NASH includes minimal criteria for establishment of the diagnosis, such as the presence of macrovesicular steatosis, hepatocyte ballooning and mixed lobular inflammatory foci. The classification of Brunt et al (3) meets these criteria. When fibrosis is present in NASH, it is generally discrete and the growing deposition of collagen in zone 3 accompanied by septum formation determines its stage.

The classification of Brunt et al (3), initially developed for NASH and used in the present study with some modifications, can be applied to the diagnosis not only of NASH but also of NAFLD as a whole. This classification system, with the modifications introduced in the present study, can easily be applied in the daily practice of pathologists and is useful for the diagnosis of mild forms of NASH, showing very good interobserver agreement for macrovesicular steatosis and good agreement for inflammatory activity and fibrosis stage. Since the method is reliable for this diagnosis, its dissemination among pathologists is recommended.

References

1. Fasio E, Álvarez E, Domínguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004;40:820-6.
2. Yoshioka Y, Hashimoto E, Yatsuji S, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and burn-out NASH. *Gastroenterology* 2004;39:1215-8.
3. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
4. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004;24:3-20.
5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
6. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-50.
7. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P et al. Silent non-alcoholic fatty liver disease – a clinical histological study. *J Hepatol* 2004;41:751-7.
8. Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease; an agenda for clinical research. *Hepatology* 2002;35:746-52.
9. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
10. Mendler MH, Kanel G, Govindarajan S. Proposal for a histological grading system for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25:294-304.
11. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005,41:1313-21.
12. Crawford AR, Lin X, Crawford JM. The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 1998;28:323-31.
13. Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Oliver D et al. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens.. *Hum Pathol*, 2004;35:1070 – 82.

14. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16.
15. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 2001;285:2486-97.
16. Jakobsson U, Westergren A. Statistical methods for assessing agreement for ordinal data. *Scand J Caring Sci* 2005;19:427-31.
17. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther* 2005;85:257-68.
18. Adams LA, Lymp JF, Sauver JST et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113-21.
19. Bacon BR, Farahvash, MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-9.
20. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:1649-57.
21. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594-8.
22. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of 42 patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;21:74-80.
23. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001;21:17-26.
24. Siqueira ACG, Cotrim HP, Rocha R et al. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:837-41.
25. Cotrim HP, De Freitas LAR, Freitas C et al. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. *Liver Int* 2004;24:131-5.
26. Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Prac Research Clin Gastroenterol* 2002;16:733-47.

27. Contos MJ, Sanyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 2002; 9:37-51.
28. Gramlich T, Kleiner DE, McCullough AJ, Matteoni CA, Boparai N, Younossi ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Pathol* 2004;35:196-9.
29. Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988;95:1056-62.
30. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998;15:246-258.
31. Bugianesi E, Leone N, Vanni E et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134-40.
32. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100.
33. Allsbrook WC Jr, Mangold KA, Johnson MH et al. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists. *Hum Pathol* 2001;32:74-80.

Table 1 Available clinical and laboratory findings of the 70 cases studied

Clinical/laboratory finding	Number of cases	Mean	Range	Number of cases with altered values (%)
BMI (kg/m ²)	36	29.74	20.2 - 43.2	17 (56.6)
AST (U/l)	63	48.55	16 - 198	31 (49.2)
ALT(U/l)	65	75.92	10 - 289	49 (75.4)
GGT (U/l)	59	117.07	12 - 574	42 (71.2)
Fasting glycemia (mg/dl)	43	102.93	74 - 230	10 (23.3)
Total cholesterol (mg/dl)	53	203.73	100 - 327	27 (51.0)
HDL (mg/dl)	47	45.28	26 - 73.7	22 (46.8)
Triglycerides (mg/dl)	44	189.73	46 - 697	26 (59.1)

Table 2 Results of the histological analysis of the 70 liver biopsies

Variable		Absolute number	%
Macrovesicular steatosis	discrete	29	41.4
	moderate	24	34.3
	marked	17	24.3
Microvesicular steatosis	present	42	60
Hepatocyte ballooning	occasional	39	55.7
	frequent	31	44.3
Portal inflammation	absent	34	48.6
	discrete	31	44.3
	moderate	3	4.3
Lobular inflammation	discrete	43	61.4
	moderate	5	7.1
	marked	2	2.9
Lipogranulomas	present	25	35.7
Mallory's hyaline	present	10	14.3
Apoptosis	present	17	24.3
Glycogenated nuclei	occasional	18	25.7
	frequent	15	21.4
Lipofuscin	present	45	64.3
Fibrosis	absent	47	67.1
	discrete	12	17.1
	moderate	7	10
	marked	2	2.9
	cirrhosis	2	2.9

Table 3 AST/ALT ratio and the respective histological findings

Case number	AST/ALT ratio	Macrovesicular steatosis	Inflammatory activity	Fibrosis stage
15	1.12	1	0	0
17	1.17	1	0	0
22	1.40	1	1	3
26	1.41	1	3	4
28	1.66	2	2	2
34	1.10	2	0	0
40	1.17	3	2	2
49	1.09	2	1	0
50	1.03	1	0	0
64	1.60	3	0	0
68	1.09	3	1	0


[tracking system home](#)
[author instructions](#)
[reviewer instructions](#)
[help](#) | [tips](#)
[logout](#)
[journal home](#)

Submit Manuscript Steps

- 1) General Information
- 2) Upload Files
- 3) **Receipt**
- 4) Approve Manuscript Files

Manuscript # **MP-2006-0731**

Please print and save this page for your records.

6 files received. File conversion may take up to **10 minutes**.

If file conversion takes longer than **40 minutes**, please contact mtshelp@nature.com. Once the files have been converted, you must approve the new PDF files before the submission is complete. If you do not approve the PDF files, your manuscript will **not** be submitted.

Manuscript #	MP-2006-0731
Current Revision #	0
Submission Date	27th Dec 06 12:19:44
Current Stage	Submission
Title	Nonalcoholic fatty liver disease: histopathological evaluation in 70 needle biopsies and interobserver agreement
Running Title	Nonalcoholic fatty liver disease
Manuscript Type	Original Article
Manuscript Comment	The first author is not a resident.
Corresponding Author	Dr. Cynthia Berenstein (Federal University of Minas Gerais) .
Contributing Authors	Dr. Caroline Cardoso , Dr. Nivaldo Toppa , Prof. Virginia Leite
Abstract	<p>Nonalcoholic fatty liver disease comprises a spectrum of lesions ranging from steatosis, steatohepatitis and cirrhosis to hepatocellular carcinoma, with nonalcoholic steatohepatitis being the progressive form of the disease. Nonalcoholic fatty liver disease is suspected in the case of hepatomegaly upon clinical examination, fat accumulation in the liver on abdominal ultrasound and/or discrete (2 to 3 times the reference value) and persistently elevated (two or more occasions) aminotransferase levels in individuals presenting no other cause of these alterations (exclusion of other liver diseases). However, these work-up methods only suggest the diagnosis. Liver biopsy is the gold standard for the diagnosis of the disease and is the only method able to differentiate nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis, to grade inflammation and to stage fibrosis. Herein, we analyzed the histopathological findings of liver biopsies and interobserver agreement in the histological evaluation of cases with a histological diagnosis of steatosis or steatohepatitis, with or without fibrosis and with no history of alcohol abuse in the exam request, with emphasis on the establishment of minimal criteria for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. Seventy needle biopsies were analyzed according to Brunt et al (1999), with modifications, and clinical data of the patients were collected. Discrete nonalcoholic steatohepatitis (grade 1) was the most common form. If fibrosis was detected, stage 1 was the most frequent. Only two cases of cirrhosis were identified. Interobserver agreement was very good for macrovesicular steatosis (KW = 0,82) and good for lobular inflammation (KW = 0,68) and fibrosis (KW = 0,73). The classification of Brunt et al (1999), with the modifications introduced here, can be applied to the diagnosis not only of nonalcoholic steatohepatitis but also of nonalcoholic fatty liver disease, representing a reliable method for use in the daily practice of pathologists.</p>
Keywords	nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, steatosis
Dual Publication	No
Duality of Interest	No
Contributing Author Notification	CKB

To simplify the handling of your paper, we create a merged PDF containing your manuscript article, figures and tables. Editors and/or Reviewers will also be able to look at the individual PDF files if necessary.

Use the **Sequence Number** column below to select the order in which these files should be presented to the Editor. All



Journal Press of the Tracking System



JOURNAL
PRESS

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#)

Your manuscript has been submitted. (MP-2006-0731).

Thank you. You have accepted the manuscript.

Home Page for Dr. Cynthia Koepfel Berenstein

Author Tasks

[Author Instructions](#)

[Submit Manuscript](#)

 [Live Manuscripts \(1\)](#)

General Tasks

[Modify Unavailability Dates](#)

[Modify Profile/Password](#)

[Knowledge Base/Help](#)

[Logout](#)

 **JournalPress**

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)

