DÉBORA RAQUEL BENEDITA TERRABUIO

**Estudo randomizado e duplo cego com uso de
difosfato de cloroquina para a manutenção de remissão da
hepatite autoimune após a suspensão da imunossupressão**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Flair José Carrilho

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Terrabuio, Débora Raquel Benedita
Estudo randomizado e duplo cego com uso de
difosfato de cloroquina para a manutenção de
remissão da hepatite autoimune após a suspensão da
imunossupressão / Débora Raquel Benedita Terrabuio.
-- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Flair José Carrilho.

Descritores: 1.Hepatite autoimune
2.Antimaláricos 3.Cloroquina 4.Terapêutica
5.Anticorpo anti-SLA/LP 6.Imunossupressão 7.Doenças
autoimunes

USP/FM/DBD-066/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

**“Eu sou aquela mulher
a quem o tempo
muito ensinou.
Ensinou a amar a vida.
Não desistir da luta.
Recomeçar na derrota.
Renunciar a palavras e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos.
Ser otimista.
Creio numa força imanente
que vai ligando a família humana
numa corrente luminosa
de fraternidade universal.
Creio na solidariedade humana.
Creio na superação dos erros
e angústias do presente.
Acredito nos moços.
Exalto sua confiança,
generosidade e idealismo.
Creio nos milagres da ciência
e na descoberta de uma profilaxia
futura dos erros e violências
do presente.
Aprendi que mais vale lutar
do que recolher dinheiro fácil.
Antes acreditar do que duvidar.”**

Cora Coralina

“ É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“ Determinação, coragem e auto-confiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Dedico aos meus pacientes, eterna fonte de conhecimento

e

à minha família, minha eterna inspiração

AGRADECIMENTOS

Esse projeto de doutorado foi muito longo! Foram 9 anos de inclusão de pacientes... Quando o estudo começou, eu ainda não fazia parte do Grupo de Doenças Autoimunes e Metabólicas do Fígado do HC-FMUSP. Mas assim que entrei em contato com o projeto, em 2005, eu realmente me identifiquei com ele, encantada com a possibilidade de tentar descobrir uma nova opção de tratamento no escasso arsenal terapêutico de uma doença rara, órfã e negligenciada, que é a Hepatite Autoimune.

Foi preciso muita dedicação, muito empenho, muitas horas para que pudesse ser concluído. E o que posso dizer no final dessa trajetória, é que cada esforço valeu a pena, eu realmente acredito no uso dos antimaláricos no tratamento da hepatite autoimune.

Nesse processo, muitas pessoas contribuíram, seja com apoio físico ou mental, a quem gostaria de agradecer imensamente. Tenho medo de esquecer alguns nomes e, de antemão, peço desculpas.

Aos meus pais, **Nadir e Alberto**, vocês são o meu começo, meu meio e meu fim. Me ensinaram a ser tipo de pessoa que sou hoje. Me ensinaram sobre honestidade, caridade, dedicação, trabalhar com amor e viver a vida dos justos. Vocês são um grande exemplo para mim, cada um do seu jeito, se completando nas qualidades que eu desejo também para mim. Obrigada por tudo! Por todas as lutas que me ajudaram a lutar para chegar onde estou hoje.

Aos meus filhos Gabriel e Guilherme, os amores da minha vida, a parte de mim que vive fora do meu corpo. Vocês são o melhor presente que eu poderia ganhar na vida, as minhas obras mais perfeitas. Meu amor incondicional a vocês. Meu pedido de perdão para todos os momentos que deixei de estar presente em prol da ciência. Espero ser sempre um exemplo de dedicação, de doação e de honestidade para vocês. Saibam que sempre os amarei, em todos os momentos, em todos os sentidos e que poderão sempre contar comigo. A vocês gostaria de deixar alguns ensinamentos, que demorei a aprender na vida:

“É proibido chorar sem aprender, levantar-se um dia sem saber o que fazer e ter medo de suas lembranças. É proibido não rir dos problemas, não lutar pelo que se quer, abandonar tudo por medo. Não transformar sonhos em realidade. É proibido não demonstrar amor. Fazer com que alguém pague por tuas dúvidas e mau-humor. É proibido ter medo da vida e de seus compromissos, não viver cada dia como se fosse um último suspiro. É proibido não buscar a felicidade, não viver sua vida com uma atitude positiva, não pensar que podemos ser melhores, não sentir que sem vocês este mundo não seria igual.” (Alfredo Cuervo Barrero).

Ao **Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado**, meu mestre, meu marido, meu companheiro. Aquele que me ensinou a ser a hepatologista, a cientista, a mãe e a esposa que sou hoje. Agradeço a você que dividiu comigo seus bens mais preciosos: seu saber, seus sonhos e seu coração. Obrigada por sempre estar a meu lado e me estimular a ser melhor e a lutar pelas coisas que acredito. Obrigada por aceitar ficar em segundo plano para que eu pudesse ser “Doutora”, algumas atitudes não tem preço, não tem como ser recompensadas. É muita bondade!

À minha grande amiga, minha irmã adotiva, **Maristela Pinheiro Freire**, que esteve sempre ao meu lado, nos momentos ruins e nos bons, aturando minhas manias e meu mau humor, sendo minha babá, ajudando sempre que precisei. Não tenho como agradecer ou retribuir tudo o que já fez por mim. Espero sempre tê-la ao meu lado, para envelhecermos juntas e felizes.

À **Dra. Elza Cotrim Soares**, minha mentora profissional, que me inspirou a fazer hepatologia e me incentivou para que eu saísse do ninho da UNICAMP e viesse desbravar novos mares em São Paulo. Obrigada por toda a inspiração.

Ao **Marcio Diniz**, no começo apenas um estatístico; depois de tantos anos, tantas discussões e tanta ajuda, já se tornou um amigo. Desejo que você trilhe um caminho cheio de vitórias. Finalmente seu trabalho dará frutos.

A **Adelaini de Toni**, por todo suporte psicológico, pelo apoio nos momentos de maior angústia, por sempre me ensinar a ver uma nova saída para os problemas da vida.

À **Lucila Maria Capellano**, por toda a disponibilidade em ajudar, por todos os galhos quebrados em momentos cruciais da minha vida profissional.

Às amigas **Andréia Evangelista, Ana Luiza Vilar Guedes, Amanda Rodrigues de Moreto Longo Galvão**, agradeço a companhia nos ambulatórios de quinta-feira, nossas conversas de fim de tarde, a compreensão com meus atrasos e minhas ausências. Obrigada pela amizade!

Ao **Prof. Dr. Edson Abdala**, meu padrinho, meu chefe, meu amigo, minha companhia das quartas-feiras. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionou.

Às **Profas. Dras. Suzane Kioko Ono, Marta Mitiko Deguti, Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira**, exemplos de mulheres, cientistas e médicas de sucesso nas quais sempre quero me espelhar. Obrigada por seus exemplos.

Ao **Prof. Flair José Carrilho**, titular da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas, que sempre me estimulou a ser uma boa cientista e aceitou com bondade a missão de ser meu orientador.

À **Claudia Arruda**, uma presença discreta e amiga, sempre presente e prestativa. Sempre com uma palavra animadora, alegrando meu dia. Obrigada por tudo!

Aos **residentes de Gastroenterologia e Hepatologia**, que estiveram presentes em cada ambulatório, atendendo aos pacientes com grande responsabilidade e carinho. E se dedicando ao máximo, apesar do cansaço. Meu obrigada a vocês pelos registros dos prontuários, pela convivência e pelos ensinamentos que me trazem dia a dia.

E por último, mas não menos importantes, gostaria de agradecer aos **meus pacientes**, que entregam suas vidas aos meus cuidados, que dividem seus ganhos e perdas comigo. Vocês sempre têm algo a me ensinar, seja na vida pessoal ou na ciência. Sem vocês, minha Medicina não teria sentido e eu não teria conseguido realizar esse trabalho. Meu obrigada a todos pela confiança e pelo carinho com que me tratam. A vocês dedico meu Juramento de Hipócrates, “aplicarei os regimes para o bem do doente segundo o meu poder e entendimento, nunca para causar dano ou mal a alguém. Conservarei imaculada minha vida e minha arte.”

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais da hepatite autoimune	2
1.2 Diagnóstico da hepatite autoimune	3
1.3 Fisiopatogenia da hepatite autoimune.....	6
1.3.1 Predisposição genética da hepatite autoimune e agentes desencadeantes.....	6
1.3.2 Mecanismos da lesão hepática.....	9
1.4 Tratamento da hepatite autoimune.....	13
1.5 Farmacocinética e mecanismo de ação dos antimaláricos na HAI	22
1.6 Efeitos colaterais e tolerância ao uso dos antimaláricos	27
1.7 Uso dos antimaláricos nas doenças hepáticas.....	34
1.8 Objetivos	38
1.8.1 Objetivo geral.....	38
1.8.2 Objetivos secundários.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 Critérios para participação no estudo	40
2.2 Cálculo do tamanho amostral.....	42
2.3 Protocolo de tratamento	42
2.4 Protocolo de seguimento durante o estudo	47
2.5 Tipagem HLA	48
2.6 Pesquisa dos autoanticorpos	49
2.6.1 Imunofluorescência indireta.....	49
2.6.2 ELISA	49
2.7 Avaliação dos efeitos colaterais	49
2.8 Análise estatística.....	50

3 RESULTADOS	52
4 DISCUSSÃO	71
5 CONCLUSÕES	88
6 ANEXOS	90
6.1 Anexo 1 - Sistema de escore revisado do Grupo Internacional de hepatite autoimune para o diagnóstico da doença (1999)	91
6.2 Anexo 2 - Sistema de escore simplificado para diagnóstico da Hepatite autoimune	92
6.3 Anexo 3 - Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq)	93
6.4 Anexo 4 - Classificação das hepatites crônicas baseada em critérios de semiquantificação, conforme consenso das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia	95
7 REFERÊNCIAS	97

LISTAS

ABREVIATURAS

AASLD	Associação Americana para
AIRE	Autoimmune regulator 1
ALT	Alanina aminotransferase
AMA	Anticorpo antimitocôndria
ANA	Anticorpo antinúcleo
Anti-LC1	Anticorpo anticitosol hepático tipo 1
Anti-LKM1	Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1
Anti-SLA/LP	Anticorpo antiantígeno hepático solúvel/antifígado pâncreas
AR	Artrite reumatóide
ASMA	Anticorpo antimúsculo liso
AST	Aspartato aminotransferase
APC	Célula apresentadora de antígenos
AUDC	Ácido ursodesoxicólico
AZA	Azatioprina
BT	Bilirrubina total
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
CQ	Difosfato de cloroquina
DMARDs	Droga antirreumática modificadora da doença
EASL	Associação Européia para estudo do fígado
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FALC	Fosfatase alcalina
FoxP3	Forkhead Transcription Factor 3
GGT	Gamaglutamiltranspeptidase
GIHAI	Grupo internacional de Hepatite autoimune
HAI	Hepatite autoimune
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCQ	Hidroxicloroquina
HLA	Antígeno Leucocitário humano

HLA-DR	Antígeno Leucocitário humano do sorotipo DR
HLA-DQ	Antígeno Leucocitário humano do sorotipo DQ
IL	Interleucina
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
HAI-1	Hepatite autoimune tipo 1
HAI-2	Hepatite autoimune tipo 2
HAI-3	Hepatite autoimune tipo 3
HAI-SM	Hepatite autoimune sem marcador
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
NK	Células Natural killer
PD	Prednisona
STAT4	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4
TCLE	Termo de consentimento livre e informado
TGF- β 1	Fator de transformação do crescimento Beta 1
Th	Linfócito T auxiliar
Th0	Linfócito T CD4+ imaturo
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
tRNA	RNA transportador

TABELAS

Tabela 1 -	Mecanismos de ação dos agentes antimaláricos.....	27
Tabela 2 -	Efeitos tóxicos não oftalmológicos dos agentes antimaláricos.....	33
Tabela 3 -	Dados clínicos, laboratoriais e histológicos dos pacientes da casuística geral	54
Tabela 4 -	Comparação dos dados clínicos, laboratoriais e histológico dos pacientes que receberam cloroquina e placebo	55
Tabela 5 -	Perfil de HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes da casuística e conforme o uso de cloroquina ou placebo	56
Tabela 6 -	Resposta do uso do difosfato de cloroquina na manutenção da remissão na Hepatite autoimune	57
Tabela 7 -	Análise de fatores associados à recidiva da hepatite autoimune pela regressão simples de Cox	59
Tabela 8	Análise de fatores associados à recidiva da hepatite autoimune pela regressão múltipla de Cox	63
Tabela 9 -	Análise do uso do difosfato de cloroquina em subgrupos específicos de pacientes com hepatite autoimune.....	65
Tabela 10 -	Causalidade entre a reação adversa ao Medicamento e a droga conforme definições do Algoritmo de Naranjo no grupo que usou difosfato de cloroquina	66
Tabela 11 -	Efeitos colaterais apresentados pelos pacientes de acordo com os critérios do CTCAE, versão 4,03	67

FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de dano hepático na hepatite autoimune.....	11
Figura 2 -	Potenciais mecanismos de ação dos antimaláricos na fisiopatogenia da Hepatite autoimune	26
Figura 3 -	Maculopatia em olho de boi, resultado do efeito tóxico retiniano dos antimaláricos	32
Figura 4 -	Protocolo de tratamento do estudo.....	46
Figura 5 -	Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo	53
Figura 6 -	Recidiva da doença após a suspensão do tratamento depois de três anos de uso de difosfato de cloroquina ou placebo	58
Figura 7 -	Recidiva da HAI de acordo com a reatividade do anticorpo anti-SLA/LP pela regressão simples de Cox.....	60
Figura 8 -	Recidiva da HAI conforme o uso de cloroquina ou placebo pela regressão simples de Cox.....	61
Figura 9 -	Recidiva da HAI de acordo com o perfil de HLA-DR3 pela regressão simples de Cox.....	62

RESUMO

Terrabuio DRB. *Estudo randomizado e duplo cego com uso de difosfato de cloroquina para a manutenção de remissão da hepatite autoimune após a suspensão da imunossupressão* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: 50-86% dos pacientes recidivam a hepatite autoimune (HAI) após a suspensão do tratamento imunossupressor. A manutenção da imunossupressão em longo prazo diminui o risco de recidiva, entretanto é necessário ajuste da dose/suspensão do tratamento em 10-30%, em razão do maior risco de neoplasias e infecções. O difosfato de cloroquina (CQ) é droga imunomoduladora que foi utilizada anteriormente em monoterapia para manutenção da remissão da HAI com diminuição da recidiva quando comparada com controle histórico. O objetivo desse estudo foi investigar a eficácia e segurança do CQ na manutenção da remissão em estudo duplo cego e randomizado e avaliar se há um subgrupo com maior benefício ao seu uso. **METODOLOGIA:** 61 pacientes com diagnóstico provável ou definitivo de HAI em remissão histológica, 90,1% HAI tipo 1; 23% com reatividade do anti-SLA/LP, 56,6% com fibrose avançada (F3/4) à inclusão no estudo, mas com doença hepática compensada, foram randomizados de forma duplo cego e aleatória para receber CQ 250 mg/d ou placebo, durante 36 meses ou até recidiva da doença. No primeiro mês a droga foi utilizada em combinação com a imunossupressão que induziu remissão; com posterior desmame semanal da prednisona, suspensão imediata da azatioprina e manutenção do CQ/placebo até 36 meses. As curvas de sobrevida livre de recidiva foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank; as razões de risco e seus respectivos intervalos de confiança foram estimados por regressão simples de Cox. Na regressão múltipla foram avaliadas co-variáveis clinicamente relevantes para recidiva. Para investigar o subgrupo com maior benefício, as interações entre a droga e reatividade de autoanticorpos e perfil de HLA foram analisadas por regressão múltipla de Cox. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher e as quantitativas pelo teste-t ou teste de Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$. **RESULTADOS:** 31 pacientes receberam CQ e 30 placebo. Não houve diferenças entre os grupos em relação aos achados clínicos, laboratoriais, histológicos e perfil de HLA. A sobrevida livre de recidiva foi significativamente maior no grupo CQ quando comparada ao placebo (59,3% X 19,9%, $p = 0,039$). Após a suspensão da medicação ao término do estudo, houve 41,6% de recidiva no grupo CQ e 0% no placebo. Na regressão simples de Cox, os fatores associados com recidiva da HAI foram uso placebo, reatividade do anticorpo anti-SLA/LP, perfil de HLA DR3 e DR8. Na regressão múltipla, o uso de placebo (razão de risco de 2,4[IC 95%:1,05-5,5], $p = 0,039$) e reatividade do anticorpo anti-SLA/LP (razão de risco= 5.4 [IC 95%:1,91-15,3], $p = 0,002$) associaram-se a maior risco de recidiva. Não foi possível definir subgrupo de maior benefício com uso de CQ no que se

refere à reatividade do anti-SLA/LP ou perfil de HLA, embora a recidiva tenha ocorrido em 100% dos pacientes anti-SLA/LP(+) no grupo placebo e 50% no grupo CQ. No grupo CQ, 54,8% apresentaram efeitos colaterais, com suspensão da droga em 19,3%. Os efeitos colaterais mais comuns foram prurido e hiperpigmentação cutânea. **CONCLUSÕES:** O CQ reduziu com segurança o risco de recidiva de HAI, mas não foi possível definir subgrupo com maior benefício com essa medicação.

Descritores: hepatite, autoimune; antimaláricos; cloroquina; terapêutica; anticorpo anti-SLA/LP; imunossupressão; doenças autoimunes.

SUMMARY

Terrabuio DRB. *A randomized double-blind study with chloroquine diphosphate for maintenance of remission of autoimmune hepatitis after immunosuppression withdrawal* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: 50-86% of patients relapse autoimmune hepatitis (AIH) after immunosuppressive treatment withdrawal, with a higher risk of progression to liver cirrhosis, death due to liver disease and liver transplantation. The maintenance of long-term immunosuppression decreases the risk of relapse, however, treatment dose adjustment and/or interruption is required in 10-30%, with increased risk of neoplasias and infections. Chloroquine diphosphate (CQ) is an immunomodulatory drug used previously in monotherapy to maintain AIH remission with a decrease risk in relapse rates when compared to a historical control. The aims of this study were to investigate the efficacy and safety of CQ in the maintenance of remission in a double-blind and randomized study, and to evaluate if there is a subgroup with a greater benefit of its use. **METHODS:** 61 patients with probable or definitive diagnosis of AIH in histological remission, 90.1% type 1; 23% with anti-SLA / LP seropositivity, 56.6% with advanced fibrosis [F3 / 4] at inclusion in the study and with compensated liver disease were randomized double-blindly to receive either CQ 250 mg/day or placebo for 36 months or until relapse. In the first month, the drug was used in combination with the immunosuppressive regimen that induced the remission; with subsequent weekly weaning of prednisone, immediate withdrawal of azathioprine and maintenance of CQ/placebo for up to 36 months. Recurrence-free survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by the Log-Rank test; the hazard ratios and their respective confidence intervals were estimated by simple Cox regression. Clinically relevant covariables for relapse were re-evaluated by multiple Cox regression. To investigate the existence of a subgroup with a greater benefit, interactions between the drug and autoantibody reactivity and HLA profile were analyzed by the Cox multiple regression. Categorical variables were compared by Fisher's exact test and the quantitative by the t-test or Mann-Whitney test. A p value of <0.05 was considered statistically significant. **RESULTS:** 31 patients received CQ and 30 placebo. There were no differences between the two groups in relation to clinical, laboratory, histological and HLA profiles. Relapse-free survival was significantly higher in the CQ group when compared to placebo (59.3% X 19.9%, p=0.039). After antimalarial withdrawal at the end of the study, there was 41.6% relapse in the CQ group and 0% in the placebo. In the Cox simple regression, factors associated with AIH relapse were placebo use, anti-SLA/LP seropositivity, and HLA DR3 and DR8 profiles. In multiple regression, placebo use (Hazard Ratio = 2.4 [95% CI: 1.05-5.5], p = 0.039) and anti-SLA/LP seropositivity

(Hazard Ratio = 5.4 [95% CI: 1.91-15.3], $p = 0.002$) were associated with a higher risk of relapse. It was not possible to define a subgroup with a greater benefit of CQ with respect to anti-SLA/LP positivity or HLA profile, although all anti-SLA/LP(+) patients in placebo group relapsed, compared to 50% in CQ group. In the CQ group, 54.8% had side effects, but 19.3% had drug withdrawal. The most common side effects were pruritus and cutaneous hyperpigmentation. **CONCLUSIONS:** Chloroquine safely reduced the risk of relapse of AIH, but it was not possible to define a subgroup with greater benefit with medication use.

Descriptors: hepatitis, autoimmune; antimalarials; chloroquine; therapeutics; anti-SLA/LP antibody; Immunosuppression; autoimmune diseases

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da hepatite autoimune

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença hepática crônica, imunomediada, mais prevalente em mulheres, frequentemente em associação com outras doenças autoimunes, com reatividade de autoanticorpos, hipergamaglobulinemia, hepatite de interface, rosetas de hepatócitos e infiltrado inflamatório com importante componente linfoplasmocitário à biópsia hepática e resposta favorável ao uso de corticosteroides e imunossupressores. Acomete todos os grupos étnicos e todas as faixas etárias, mas predomina em mulheres jovens ⁽¹⁾. Quando não tratada, evolui rapidamente para cirrose hepática com insuficiência do órgão e óbito.

Há poucos estudos robustos na literatura sobre sua incidência e prevalência, entretanto é considerada relativamente rara. No Brasil, apesar dos poucos estudos realizados, a HAI representa 5-19% das doenças hepáticas dos principais centros, responsável por menos de 5% dos pacientes em lista de transplante e por cerca de 6% dos transplantes realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) ⁽²⁾.

1.2 Diagnóstico da hepatite autoimune

A HAI não apresenta características patognomônicas e não tem marcadores com sensibilidade e especificidade suficientes para definir o seu diagnóstico isoladamente ^(3, 4). Apesar da positividade dos autoanticorpos ser importante para o diagnóstico e classificação da doença, ela pode estar presente em outras doenças hepáticas, infecciosas e reumatológicas, e ausente em até 10% dos casos de HAI ⁽⁵⁾. Assim sendo, o diagnóstico definitivo é feito mediante a combinação de achados clínicos, laboratoriais e histológicos, com exclusão de outras causas de doença hepática. Para uniformizar e melhor definir o diagnóstico da doença, o Grupo Internacional de Hepatite autoimune (GIHAI) estabeleceu sistema de escore diagnóstico que permitiu caracterizar a HAI como provável ou definitiva (anexo 1) ⁽⁴⁾. O paciente apresenta diagnóstico definitivo quando pontua mais do que 15 no período pré-tratamento e mais do que 17 após avaliação da resposta ao tratamento. Esse escore apresenta sensibilidade de 97-100% e especificidade de 60%, porém é falho para diagnosticar as formas híbridas (HAI em associação com colangite esclerosante primária ou com colangite biliar primária). Em 2008, Hennes e cols. sugeriram novo sistema de escore simplificado, utilizando somente quatro variáveis independentes: alterações histológicas típicas, reatividade de autoanticorpos, níveis elevados de IgG e exclusão de hepatites virais (anexo 2), e o diagnóstico “provável” seria estabelecido quando a soma fosse ≥ 6 e definitivo quando ≥ 7 , com 81% de

sensibilidade e 99% de especificidade. Todavia, esse escore ainda não foi validado em estudos prospectivos ⁽⁶⁾.

Os autoanticorpos hepáticos são de fundamental importância para o diagnóstico e classificação da HAI. Os autoanticorpos rotineiramente pesquisados na prática clínica são antinúcleo (ANA), antimúsculo liso (ASMA), antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM1), anticitosol hepático tipo 1 (anti-LC1) e antimitocôndria (AMA). Os pacientes com HAI apresentam títulos elevados de autoanticorpos, maiores ou iguais a 1/40 nos testes de imunofluorescência indireta em cortes de tecidos de roedores ^(5, 7). O perfil de reatividade dos autoanticorpos permite a classificação da HAI em tipos com características bioquímicas, clínicas, sorológicas e imunogenéticas mais homogêneas. A HAI-1 é caracterizada pela positividade do ASMA e/ou ANA. Na HAI-2, observa-se positividade para anti-LKM1 associada ou não à presença do anti-LC1 ^(5, 7-9). Um terceiro tipo de HAI, definido pela presença do anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado pâncreas (anti-SLA/LP), tem sido sugerido, mas não foi aceito pelo GIHA, já que o anticorpo pode ser encontrado na HAI-1 ^(10, 11) e, menos frequentemente, na HAI-2 ^(5, 12). Pacientes com HAI- 2 são mais jovens ao diagnóstico, apresentam maiores níveis de aminotransferases e bilirrubinas, menores níveis de gamaglobulinas quando comparados àqueles com HAI-1 ^(8, 9, 13). O quadro clínico é mais grave, com maior frequência de insuficiência hepática aguda grave e progressão mais rápida para cirrose hepática. No entanto, não há diferenças na indicação do tratamento, na medicação utilizada ou na resposta ao tratamento ^(7-9, 13-16).

O anticorpo anti-SLA/LP foi descrito em 1987, originalmente como anticorpo distinto do anticorpo antifígado-pâncreas ⁽¹⁷⁾. Posteriormente foi caracterizado que eles compartilhavam o mesmo antígeno-alvo e o anticorpo recebeu o nome de anti-SLA/LP. Pode ser detectado por radioimunoensaio, ELISA, immunoblotting ou dot-blotting, não sendo detectado por imunofluorescência indireta ⁽⁷⁾. Seu antígeno alvo é uma fosfoserina (Sep)-tRNA: selenocisteína (Sec)-tRNA sintase (ribonucleoproteína de transferência envolvida no transporte de selenocisteína) ^(5, 7, 16). Esse anticorpo é altamente específico para HAI (99%), e é encontrado em 10-30% dos casos de HAI e em 20-30% dos casos sem marcadores ^(5, 7, 16). Sua grande utilidade é no diagnóstico dos quadros de HAI sem marcador, em que sua positividade auxilia na confirmação diagnóstica ^(5, 9, 18, 19). Sua ocorrência é variável nos diversos grupos étnicos, sendo menos comum nos japoneses (7%) e mais comum nos pacientes alemães (19-22%) ^(11, 20), variabilidade que reflete as diferenças no perfil genético da doença. Em estudo com casuística nacional com 243 pacientes com HAI do HC-FMUSP, 22% dos pacientes apresentavam positividade para o anti-SLA/LP, sendo 23% na HAI-1, 13% na HAI-2 e 33% nos casos de HAI-SM ⁽⁵⁾.

Em alguns estudos, os pacientes com positividade para o anticorpo anti-SLA/LP apresentaram achados histológicos mais exuberantes, maior tempo para atingir remissão bioquímica ⁽¹²⁾, maior chance de recidiva após suspensão do tratamento ^(11, 12, 21, 22) e evolução mais frequente para transplante hepático e óbito ^(12, 21). O anti-SLA/LP parece marcar formas mais

graves e recidivantes de HAI, embora nem todos os estudos tenham sido unânimes em documentar essa relação ⁽²⁰⁾.

1.3 Fisiopatogenia da hepatite autoimune

A fisiopatogenia da HAI é resultado de predisposição genética à autoimunidade associada à exposição a agentes ambientais/patógenos exógenos que apresentam reatividade cruzada com autoantígenos hepáticos estruturalmente semelhantes (mimetismo molecular), levando à perda da imunotolerância. Como consequência, há resposta imune aberrante e descontrolada, com consequente necrose de hepatócitos, inflamação e desenvolvimento de fibrose hepática.

1.3.1 Predisposição genética na HAI e agentes desencadeantes

A predisposição genética para HAI está ligada aos genes do MHC classe II, mais especificamente, ao locus HLA-DR, localizado no braço curto do cromossomo 6. Em pacientes caucasianos e orientais, a suscetibilidade genética para HAI-1 está associada aos alelos DRB1*0301 e DRB1*0401 (que codificam os antígenos HLA DR3 e DR4, respectivamente) ^(9, 15, 23-25). Na América do Sul (Brasil, Argentina e Venezuela), entretanto, a suscetibilidade está relacionada primariamente ao HLA DRB1*1301, com importância do DRB1*0401 apenas em argentinos ⁽²⁶⁻²⁸⁾.

No Brasil, em particular, a associação com HLA DR13 está relacionada apenas aos pacientes com reatividade para o ASMA e para

antígenos presentes nos microfilamentos, não sendo observada relação com a positividade do ANA ⁽²⁷⁾. O HLA DR3 só tem importância nos pacientes com HAI-1 negativos para o HLA DR13. Já a suscetibilidade genética da HAI-2 está relacionada ao alelo DRB1*0701 e ao DRB1*0301 nos pacientes com negatividade do HLA DR7 ⁽²⁷⁾.

O perfil de HLA DR4, como em pacientes da raça japonesa, se associa a doença mais leve, de apresentação tardia, com boa resposta terapêutica até mesmo ao ácido ursodesoxicólico ⁽²⁹⁻³¹⁾. Na América do Sul (Brasil e Argentina), a doença ocorre em idade mais precoce e com maior gravidade quando comparada à dos pacientes norte-americanos ^(23, 24, 29, 32). Um estudo comparando 115 pacientes brasileiros com 161 norte-americanos evidenciou que os brasileiros apresentavam maior frequência do perfil de HLA-DR13, eram mais jovens ao diagnóstico, apresentavam menor frequência de doenças autoimunes extra-hepáticas, maiores níveis de AST e gamaglobulinas, maior positividade do ASMA e menor reatividade do ANA ⁽³²⁾.

O mecanismo pelo qual o HLA está associado à doença não é totalmente conhecido, mas presume-se que reflita a intensidade com a qual os autoantígenos são apresentados e processados pelo sistema imune.

Outros polimorfismos além do MHC foram associados à ocorrência de HAI, incluindo polimorfismos do gene CTLA-4 (mediador de sinal inibitório), gene do ligante do Fas (que codifica proteínas importantes para apoptose), promotor do gene do fator de necrose tumoral α , gene do receptor da vitamina D, gene STAT4 (proteína codificada por esse gene é membro da

família STAT de fatores ativadores de transcrição, essencial para a (medicação) mediação das respostas IL-12 em linfócitos e regulação da diferenciação de células T auxiliares), gene TGF- β 1 (fator transformador de crescimento beta 1, que atua na proliferação, diferenciação, transformação, sinalização e apoptose celular), gene AIRE1 (*autoimmuneregulator*) e genes de várias citocinas ^(19, 25, 33). Esses polimorfismos não foram encontrados em todas as populações de HAI e não são específicos para a doença, ocorrendo também em doenças autoimunes extra-hepáticas. Sua importância no fenótipo da doença é controversa e ainda pouco esclarecida. Esses polimorfismos parecem modificar ou potencializar a resposta imune, independentemente da natureza primária da doença imunomediada.

A ocorrência de quadros de hepatite aguda indistinguíveis da HAI, com positividade de autoanticorpos e aumento dos níveis de IgG, secundários ao uso de drogas como nitrofurantoína, metildopa, propiltiouracil, infliximabe, atorvastatina e outras é evidência importante a favor do papel de agentes ambientais na patogênese da HAI. Em alguns desses casos, a suspensão da droga leva à normalização da bioquímica hepática, mas em outros, essa normalização pode levar meses a anos, e às vezes é necessária a administração de corticoide e imunossupressores, como na HAI clássica. Também há relatos de casos de HAI desencadeados pelos vírus da hepatite A ⁽³⁴⁾, Epstein Barr ⁽³⁵⁾, citomegalovírus ⁽³⁶⁾, vírus das Hepatites B ⁽³⁷⁾ e C ^(38, 39), varicela zoster ⁽⁴⁰⁾ e sarampo ^(41, 42).

1.3.2 Mecanismos da lesão hepática

Os linfócitos T são as células predominantes nas áreas com hepatite de interface da HAI, a maioria deles com o fenótipo CD4 auxiliar (T helper) e uma minoria com o fenótipo CD8⁺ (T citotóxico). Além dos linfócitos T, outras células encontradas em menor quantidade incluem células NK (natural killer), linfócitos B, macrófagos e plasmócitos. A fisiopatogenia da lesão hepática envolve tanto a resposta inata quanto a resposta adaptativa do sistema imune e é orquestrada pelos linfócitos CD4⁺ que reconhecem autoantígenos ^(25, 33).

Na presença de sinais co-estimulatórios adequados, a resposta imune é iniciada pela apresentação do complexo autoantígeno-MHC classe II na superfície das células apresentadoras de antígeno ao linfócito TCD4⁺ imaturo (Th0). Uma vez ativado, na dependência do tipo de citocinas no microambiente e do tipo de antígeno, as células Th0 podem se diferenciar em Th1, Th2 e Th17. Essas células efectoras iniciam uma cascata de reações imunes determinadas pelo perfil de citocinas por elas produzidas ⁽²⁵⁾.

As células Th1 produzem interferon gama (IFN- γ) e IL-2; o IFN- γ é considerado o principal responsável pelo dano tecidual na HAI. O IFN- γ estimula linfócitos citotóxicos (CD8⁺), aumenta a expressão de moléculas MHC classe I pelos hepatócitos, induz a expressão de moléculas MHC classe II nos hepatócitos e ativa monócitos/macrófagos, que por sua vez, liberam IL-1 e TNF- α ⁽²⁵⁾.

As células Th2 produzem IL-4, IL-10 e IL-13 induzindo a maturação de linfócitos B em plasmócitos, com consequente produção de autoanticorpos.

Os autoanticorpos podem contribuir para o dano hepático pela ativação do complemento e pela citotoxicidade mediada por linfócitos citotóxicos ⁽²⁵⁾.

As células Th17, que se desenvolvem na presença do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e IL-6, produzem IL-17, IL-22, TNF- α . A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que induz fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzirem outras citocinas (incluindo IL-6) que medeiam a infiltração tecidual e lesão hepatocitária. A IL-6 por sua vez, em associação ao TGF- β promove a geração adicional de células Th17 formando uma alça de *feedback* positivo. Nas doenças hepáticas autoimunes há um desbalanço entre as células pró-inflamatórias Th17 e células T reguladoras (Tregs) anti-inflamatórias; um dos orquestradores do equilíbrio células Th17/Tregs é o TGF- β . O TGF- β sozinho pode promover a expressão de células Foxp3⁺ e induzir a diferenciação das células Tregs. A frequência de células Foxp3⁺ (marcador das Tregs) gerada em presença de TGF- β é inversamente relacionada aos níveis de IL-6, sendo extinta em presença de IL-6 exógena. A IL-6 age em sinergia com TGF- β favorecendo a diferenciação Th17. Assim, a IL-6 age com imunomodulador chave na sinalização TGF- β promovendo tanto a diferenciação Tregs quanto Th17 ^(25, 43, 44). Há estudos recentes descrevendo aumento do número das células Th17 e suas interleucinas no sangue periférico e fígado de pacientes com HAI quando comparados a controles saudáveis ⁽⁴⁵⁾.

APC- célula apresentadora de antígeno, MHC: complexo maior de histocompatibilidade, IL- interleucina, TNF: fator de necrose tumoral, IFN: interferon. Adaptado de R. Liberal, G. Mieli-Vergani, D. Vergani. Autoimmune hepatitis: From mechanisms to therapy. Rev Clin Esp 2016 ⁽²⁵⁾.

Figura 1 - Mecanismo de dano hepático na HAI

As células T auto-reativas circulantes deveriam sofrer extinção pelos mecanismos periféricos de autotolerância para minimizar os danos teciduais; as células T reguladoras (Tregs) são o ponto chave para essa regulação. Habitualmente as Tregs podem induzir apoptose das células imunes e inflamatórias, inibir as células hepáticas estreladas, suprimir a produção de IL-17 e a proliferação de linfócitos Th17 e limitar a diferenciação e proliferação de linfócitos citotóxicos CD8⁺ que infiltram o fígado. Essa ampla gama de ações imunossupressoras pode minimizar o dano tecidual da resposta imune pró-inflamatória. Alguns estudos demonstraram a deficiência numérica e funcional das células Tregs na HAI em comparação com grupo controle sadio ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Foi identificada menor frequência de Tregs CD4⁺CD25⁺ e diminuição da expressão e menores níveis do fator de transcrição FOXP3 (*forkhead transcription factor 3*), defeito este, mais evidente na apresentação

da doença que durante a remissão induzida pelo tratamento e que apresenta relação inversa com os títulos dos autoanticorpos ^(47, 49). Entretanto, é conhecido que a maioria dos linfócitos T humanos CD4⁺ com expressão do CD25 não apresenta capacidade supressora e esses linfócitos não são realmente Tregs; na realidade menos do que 10% dos linfócitos T CD4⁺CD25⁺ do sangue humano são realmente Tregs, o que faz com que a expressão do CD25 não seja bom marcador para avaliar a função das Tregs, ainda mais na HAI, em que os níveis sanguíneos periféricos sofrem influência da atividade da doença e uso de medicações. Um método mais confiável e específico para discriminar as Tregs requer o uso de marcadores adicionais para sua definição, por exemplo, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{baixo} ou a quantificação do estado de metilação da região desmetilada do promotor do FoxP3 específica das Tregs. Com o uso dessa metodologia adicional não foi possível a confirmação da diminuição numérica das Tregs na HAI ⁽⁵⁰⁾. As razões para essa discrepância ainda não estão totalmente esclarecidas, provavelmente relacionadas com diferenças metodológicas. É possível que haja desequilíbrio mais restrito entre efetores e reguladores que sejam específicos para autoantígenos relevantes na HAI. No entanto, a análise das Tregs antígeno-específicas que reconhecem autoantígenos relevantes é ainda mais difícil, seja pela baixa identificação dos autoantígenos relacionados à doença, seja pela baixa frequência no sangue de Tregs antígeno-específicas. Contudo, há razões para se acreditar que o aumento do número das Tregs possa auxiliar no tratamento da doença ⁽⁵¹⁾.

Em relação ao déficit funcional, foi encontrado que Tregs isoladas de pacientes com HAI são falhas em restringir a proliferação de células efectoras CD4 e CD8 e a produção de IFN- γ por células CD8 ^(49, 52), sendo também pouco eficazes em induzir ambiente rico em TGF- β que apoie e melhore a sua própria função ⁽⁵³⁾.

1.4 Tratamento da hepatite autoimune

O objetivo do tratamento na HAI é a obtenção da remissão completa da doença (normalização bioquímica e atividade histológica ausente ou mínima) com a intenção de prevenir a progressão da doença hepática ^(3, 4). Esse alvo é alcançado com tratamento imunossupressor de manutenção em longo prazo e com a remissão sustentada após suspensão do tratamento. A HAI não tratada apresenta mau prognóstico, com taxas de sobrevida em cinco e 10 anos de 50% e 10%, respectivamente ⁽⁵⁴⁾. Até 40% dos pacientes com doença grave não tratada evoluem para óbito em seis meses a partir do diagnóstico e há evolução para cirrose hepática em pelo menos 40% dos sobreviventes ⁽⁹⁾. A sobrevida dos pacientes responsivos ao tratamento é semelhante à da população normal e excede 80% em 20 anos ^(9, 54, 55).

De acordo com as recomendações da Associação Americana para o Estudo das Doenças Hepáticas (AASLD) ^(9, 56), as indicações absolutas para tratamento são níveis de AST maiores ou iguais a 10 vezes o valor normal, aumento maior ou igual a cinco vezes das aminotransferases associados a níveis de gamaglobulinas maiores que duas vezes o valor normal ou

achados histológicos de necrose em ponte ou necrose multiacinar. De acordo com o consenso europeu e britânico, devem ser tratados os pacientes com fibrose hepática avançada ou cirrose hepática compensada bem como aqueles com índice de atividade histológica $\geq 4/18$, de acordo com a classificação de Ishak (doença ativa) ^(8, 57). Nos outros casos há que se considerar a idade, presença de comorbidades e o desejo do paciente na indicação do tratamento ^(8, 9, 15, 57).

O tratamento convencional consiste de prednisona (PD) em monoterapia, na dose de 60 mg/d (1 mg/kg/d), ou na dose de 30 mg/d associada à azatioprina (AZA), inicialmente 50 mg/d, podendo-se atingir até 2mg/kg/d após a redução da dose inicial de prednisona. Ambas opções apresentam taxas similares de resposta ^(8, 9, 57), entretanto o tratamento combinado associa-se à menor ocorrência de efeitos colaterais, 10%, quando comparado com a prednisona em monoterapia, 44%, particularmente em pacientes cirróticos (25% x 8%) ^(1, 9). A opção por esses tratamentos é baseada em estudos controlados realizados há mais de quatro décadas, que indicaram o efeito benéfico do corticoide no tratamento da HAI, com aumento da sobrevida imediata e em longo prazo, com melhora da sintomatologia, redução ou normalização das alterações laboratoriais e histológicas hepáticas e prevenção ou reversão da fibrose hepática ⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾.

O alvo do tratamento é a normalização das enzimas hepáticas, bem como dos níveis de IgG/gamaglobulinas com a menor dose possível de imunossupressão, já que o aumento persistente das aminotransferases associa-se a recidiva após suspensão do tratamento, presença de atividade

inflamatória no exame histológico hepático, progressão para cirrose hepática e a má evolução em longo prazo. A taxa de resposta completa (normalização bioquímica e remissão histológica) é de cerca de 80% após três anos de tratamento ^(8, 9, 15, 25, 54, 62, 63).

O consenso Americano da AASLD ⁽⁹⁾ e consenso europeu do EASL publicado em 2015 ⁽⁸⁾ recomendam a realização de biópsia hepática para documentar a remissão histológica da doença antes da suspensão da imunossupressão. Essa recomendação é baseada no achado de que cerca de 50% dos pacientes que apresentam enzimas hepáticas e níveis de gamaglobulinas normais durante o tratamento, ainda apresentam hepatite de interface na biópsia e apresentarão recidiva da doença em caso de suspensão do tratamento. Também se recomenda tempo mínimo de dois anos de normalização das enzimas hepáticas e dos níveis de IgG antes da suspensão do tratamento ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

A recidiva após a suspensão da imunossupressão ocorre em 50-86% dos pacientes, na maioria das vezes dentro do primeiro ano, com necessidade de reintrodução do tratamento; essas taxas variam conforme o critério de recidiva utilizado, o tempo de seguimento e a população estudada ^(8, 9, 25, 57). Há diferentes critérios para diagnóstico da recidiva, e os critérios adotados pela AASLD consideram aumento de enzimas hepáticas acima de três vezes o valor superior da normalidade ⁽⁹⁾ enquanto os critérios do GIHA1 aumento acima de duas vezes ⁽⁴⁾, sem necessidade de confirmação histológica. Pacientes que apresentam múltiplas recidivas evoluem mais frequentemente para cirrose hepática, óbito por doença hepática e

necessidade de transplante hepático que aqueles que permanecem em remissão sustentada ⁽⁶⁷⁾. Pacientes que apresentam recidivas e são retratados também estão aptos a atingir resposta completa ao tratamento, como antes da suspensão do tratamento ⁽⁶⁸⁾.

Além da normalização dos níveis de IgG/gamaglobulinas e das enzimas hepáticas antes da suspensão do tratamento, outros fatores relacionados ao menor risco de recidiva da doença em diferentes estudos foram idade ao diagnóstico ≥ 18 anos ⁽⁶⁹⁾, etnia japonesa (29,9% de recidiva) ⁽⁷⁰⁾, bilirrubina total ao diagnóstico $\leq 1,5$ mg/dL, AST ao diagnóstico ≤ 250 UI/L, menores níveis de gamaglobulina ao diagnóstico (particularmente $< 3,4$ g/dL) ⁽⁷¹⁾, atividade de interface mínima/ausente e ausência de plasmócitos na biópsia hepática de controle após normalização bioquímica (valor preditivo positivo para recidiva de 92%, sensibilidade de 31%) ⁽⁷²⁾, negatividade para o anticorpo anti-SLA/LP (conforme já mencionado previamente) ⁽²¹⁾. Fatores como concomitância de doenças autoimunes extra-hepáticas e idade à suspensão do tratamento < 45 anos se associaram a maior risco de recidiva em estudo holandês, mas esse achado não foi confirmado por outros estudos ⁽⁶⁶⁾. Entre todos os fatores de risco para recidiva encontrados nos diferentes estudos, o que parece ter maior impacto na manutenção da remissão após a suspensão do tratamento é a normalização das enzimas hepáticas e níveis de gamaglobulina/IgG e resolução histológica antes da suspensão da imunossupressão.

Os pacientes que recidivam a doença apresentam maior risco de progressão para cirrose hepática, óbito por causa hepática e evolução para

transplante hepático. As opções atuais para manutenção do tratamento por longo prazo incluem doses baixas de prednisona (≤ 10 mg/d) associadas à azatioprina ou azatioprina em monoterapia na dose de 2 mg/kg/dia ^(8, 9, 74), mas há de se considerar que 10-30% dos pacientes apresentam efeitos colaterais relacionados ao corticoide com necessidade de ajuste da dose ou suspensão do tratamento e que 6% dos pacientes que utilizam azatioprina 2 mg/kg/dia por tempo prolongado evoluem com supressão medular e 32% necessitam ajuste da dose por efeitos colaterais ⁽¹⁾.

Os efeitos colaterais do corticoide são a causa mais comum de suspensão do tratamento. Alterações estéticas ocorrem em cerca de 80% dos pacientes após dois anos de tratamento com corticosteroides ^(1, 9). Efeitos colaterais graves como osteoporose com compressão vertebral, diabetes descompensado, psicose, infecções oportunistas e neoplasias são incomuns e costumam ocorrer após 18 meses de uso de doses de corticoide próximas de 20 mg/dia ^(1, 9). As complicações relacionadas ao uso da azatioprina na HAI acometem cerca de 10% dos pacientes e ocorrem naqueles pacientes que fazem uso de dose mais alta da medicação. Os efeitos colaterais incluem hepatite colestática ⁽⁷⁵⁾, pancreatite ⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾, náuseas/vômitos, rash cutâneo, infecções oportunistas, supressão medular e neoplasias ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾. Cinco por cento dos pacientes tratados desenvolvem reações adversas graves com necessidade de suspensão do tratamento. O principal efeito colateral é citopenia, que ocorre em aproximadamente 46% dos pacientes e é grave em 6%, porém o achado de hipertensão portal, comum a muitos pacientes com a doença, contribuiu para sua

ocorrência/gravidade ⁽⁸²⁾. Pacientes com cirrose hepática, idosos e gestantes apresentam maior risco de efeitos colaterais das medicações ^(79, 83). Ao considerar que em nossa casuística 54,6% dos pacientes submetidos à biópsia hepática (81% da casuística geral) ao diagnóstico apresentam cirrose hepática, nossa população estaria sob maior risco de ocorrência de efeitos colaterais com necessidade de suspensão da medicação ⁽⁸⁴⁾.

Além disso, o uso de azatioprina associa-se a risco de neoplasia extra-hepática 1,4 vezes maior quando comparado ao da população geral, após ajuste para sexo e idade. Na HAI, a incidência de neoplasia extra-hepática é de 1/194 pacientes-ano, sendo que a probabilidade de detecção de tumor é de 3% depois de 10 anos de tratamento, e não há sítio específico, nem relação com idade, sexo ou regime ou tempo acumulado de tratamento ⁽⁸⁵⁾.

Um avanço significativo no tratamento da HAI seria identificar drogas que permitissem a manutenção da remissão da doença após suspensão do tratamento imunossupressor e apresentem um bom perfil de segurança permitindo assim um melhor controle da doença em longo prazo, com baixa incidência de efeitos colaterais.

Os antimaláricos são drogas imunomodulatórias, sem efeito imunossupressor, prescritas há quase 400 anos, que vêm sendo amplamente utilizados nas doenças autoimunes reumatológicas. Seu primeiro uso foi como medicação antipirética em 1650 e posteriormente para o tratamento da malária. Com o melhor conhecimento de seus múltiplos mecanismos de ação, o espectro de sua utilização vem se ampliando,

incluindo o tratamento de doenças reumatológicas, dermatológicas e até mesmo doenças neoplásicas. Os primeiros relatos do uso dos antimaláricos nas doenças autoimunes do tecido conjuntivo datam de 1894 quando Payne e cols. descreveram sua eficácia no tratamento de lesões cutâneas do lúpus eritematoso sistêmico ⁽⁸⁶⁾. A quinacrina (derivada da quinina) foi utilizada na segunda guerra mundial para tratamento/prevenção de malária com alívio dos sintomas reumatológicos dos soldados (artrite e rash), o que motivou seu estudo nas doenças reumatológicas ⁽⁸⁷⁾.

No lúpus eritematoso sistêmico os antimaláricos apresentam múltiplos efeitos benéficos, diminuindo o risco e retardando o tempo de ocorrência de reativações na fase quiescente da doença; até mesmo de manifestações mais graves como vasculite, mielite transversa e nefrite lúpica, embora essa proteção não tenha obtido diferença estatisticamente significativa em alguns estudos ^(88, 89). Uma revisão sistemática da literatura inglesa realizada entre 1982 e 2007 em pacientes portadores de Lúpus eritematoso sistêmico, evidenciou que o difosfato de cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ) podem prevenir as agudizações da doença e aumentar a sobrevida em longo prazo (com alto nível de evidência), protegem contra dano irreversível em órgãos, trombose e perda de massa óssea (moderado nível de evidência). A toxicidade pelos antimaláricos foi infrequente, leve e geralmente reversível, sendo que a HCQ apresentou melhor perfil de segurança ⁽⁹⁰⁾.

Um estudo duplo-cego randomizado que avaliou o efeito da suspensão da HCQ em 47 pacientes com LES na fase quiescente

evidenciou que os pacientes que se mantiveram em uso de HCQ apresentaram um risco 2,5 vezes menor de agudização da doença (aparecimentos de novos sintomas ou piora da gravidade de sintomas pré-existent) quando comparados àqueles que permaneceram em uso de placebo; e as agudizações aconteceram num período de tempo mais prolongado. Além disso, o risco de agudização grave da doença com necessidade de interrupção do estudo também foi 6,1 vezes maior no grupo placebo e os autores concluíram que pacientes na fase quiescente do LES que fazem uso de HCQ apresentam menor chance de agudização da doença ⁽⁹¹⁾.

Em 1996, um estudo randomizado com uso de placebo ou CQ em 24 pacientes portadores de LES, evidenciou que essa droga preveniu a exacerbação da doença, diminuiu a dose dos medicamentos necessária para controle da doença e auxiliou na indução de um melhor controle da doença em paciente sem manifestações graves ⁽⁹²⁾. Nesse estudo não houve efeitos colaterais significativos.

Mais recentemente, um estudo caso-controle de pacientes com LES do Grupo Latino Americano de Estudo de Lúpus (GLADEL) evidenciou que o uso mais frequente de antimaláricos (quando comparado a nunca usar) se associou à proteção contra a ocorrência de agudizações da doença na análise multivariável, com OR = 0.722 e intervalo de confiança de 0,522-0,998 ($p = 0,004$) ⁽⁹³⁾.

Por conta das múltiplas evidências em literatura sobre o benefício do uso dos antimaláricos no LES, o consenso brasileiro para tratamento do LES

orienta o uso contínuo de antimaláricos em todos os pacientes (a não ser em casos de contraindicação), independentemente do órgão acometido, nas fases de indução e remissão da doença, com a finalidade de reduzir a atividade da doença e tentar poupar o uso de corticoides, com benefício adicional de diminuição da frequência de infecções nos pacientes com acometimento renal ^(94, 95).

Na artrite reumatoide, há evidências de melhora clínica com uso combinado do CQ e, em menor proporção da HCQ, com outras drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) no acometimento moderado e uso isolado no acometimento muito leve ⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Os antimaláricos apresentam leve ação modificadora da doença e bom perfil de segurança na gestação, entretanto não retardam a progressão do dano articular de forma tão efetiva quanto os outros DMARDs ^(86, 98). Assim como no LES, o uso dos antimaláricos se associou à melhora do perfil metabólico, com redução do risco de desenvolvimento de diabetes e melhora do perfil lipídico ⁽⁹⁹⁾.

Os antimaláricos também foram utilizados em outras doenças autoimunes extra-hepáticas como síndrome de Sjogren, síndrome do anticorpo antifosfolípide, lúpus cutâneo. Em todas elas modula a resposta autoimune, promove melhora sintomática e do perfil metabólico dos pacientes, com baixa incidência de efeitos colaterais.

1.5 Farmacocinética e mecanismo de ação dos antimaláricos (difosfato de cloroquina e hidroxicloroquina) na hepatite autoimune

O CQ e a HCQ são bases fracas do grupo das 4-aminoquinolinas, sendo que o CQ foi inicialmente sintetizada em 1943 e a HCQ em 1955. O CQ foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial nos Estados Unidos da América do Norte e na Alemanha, com a finalidade de obtenção de um antimalárico mais eficaz e menos tóxico. A HCQ difere do CQ por um radical hidroxietil ligado à cadeia lateral ^(100, 101). O CQ é 2-3 vezes mais potente que a HCQ ⁽¹⁰²⁾, entretanto apresenta maior risco de retinopatia.

O CQ apresenta boa biodisponibilidade após administração oral, com ampla distribuição nos tecidos e maior afinidade por tecidos pigmentados como a pele e células da retina (atingindo concentrações 100-200 vezes maior do que a plasmática); tem baixa retenção no tecido adiposo. A distribuição do fármaco é relativamente lenta em um volume aparentemente muito grande, refletindo sua distribuição nos tecidos solúveis em água. O volume de distribuição atinge 200-800 L/kg quando calculado a partir das concentrações plasmáticas e 200 L/kg quando estimado a partir da análise do sangue total, resultando em concentrações no sangue total seis a dez vezes mais altas do que as concentrações plasmáticas. O CQ liga-se moderadamente (60%) às proteínas plasmáticas e sofre metabolismo primariamente hepático, por enzimas do citocromo P450, resultando em seus metabólitos ativos desetil- (40%) e bisdesetil- (10%) cloroquina. Os

níveis plasmáticos do fármaco logo após sua administração são determinados pela velocidade de distribuição e não pela eliminação. Devido à sua extensa ligação aos tecidos, há demora em se obter concentrações plasmáticas eficazes e concentrações séricas estáveis só são atingidas após 4-6 semanas ^(101, 103-106). A depuração renal corresponde a cerca de metade da sua depuração sistêmica total; uma quantidade menor é excretada nas fezes, pele e leite materno. Vinte e um a 47% da dose é excretada sem metabolismo. A meia vida varia de 30 a 60 dias e vestígios do fármaco podem ser encontrados nos tecidos até cinco anos após a suspensão da medicação ^(101, 103-106).

O mecanismo de ação envolve diversas etapas da resposta imune. Um dos mecanismos decorre de sua ação lisossomotrópica, com interferência na função lisossomal. Nas células T, os lisossomos exercem dupla função, degradação do material endocitado e participação da apoptose das células apresentadoras de antígenos (APCs). O CQ e a HCQ são bases fracas que atravessam livremente as membranas celulares e se acumulam em lisossomos e endossomos (vesículas citoplasmáticas ácidas), onde permanecem aprisionadas em estado protonado. Com isso, há aumento do pH nos lisossomos, interferindo na ligação de peptídeos antigênicos com moléculas do MHC Classe II, evitando assim, a apresentação do antígeno aos linfócitos T CD4⁺ (interferência na função das APCs), o que leva à inibição da produção de várias citocinas que participam da geração da resposta inflamatória nas doenças imunomediadas. Aparentemente, a inibição da ligação com MHC classe II ocorre apenas

para autoantígenos e não para antígenos exógenos, porque os autoantígenos (ao contrário dos exógenos) são peptídeos com baixa afinidade, que não são capazes de se ligar às cadeias alfa e beta das moléculas do MHC quando há aumento do pH da vesícula, o que faz dos antimaláricos drogas imunomoduladoras, sem efeito imunossupressor^(101, 107).

As citocinas particularmente afetadas incluem IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, IL-22, Interferon- α e TNF- α ⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾. A IL-6 é um potente mediador inflamatório, cuja ação na HAI já foi bem documentada anteriormente, logo uma droga que provoque sua inibição poderia ter papel relevante no tratamento da HAI.

A descoberta mais recente para entendimento do mecanismo de ação dos antimaláricos foi a descoberta do seu efeito antagonista sobre os receptores do tipo Toll, que são receptores transmembrana do tipo I, fundamentais na resposta imune inata, responsável pelo mecanismo de defesa inicial à detecção de antígenos patogênicos. Após sua ativação pela exposição ao patógeno, estimula vias mais específicas da resposta imune adquirida. Os TLRs que reconhecem ácidos nucleicos (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) localizam-se em compartimentos intracelulares para minimizar possível exposição acidental de material nucleico do próprio indivíduo; eles são ativados apenas quando o material nuclear estranho é apresentado por moléculas especializadas que facilitam a entrega de antígenos para o compartimento intracelular. Contudo, o clareamento ineficaz de material celular apoptótico resulta na exposição aos componentes do próprio

hospedeiro, com ativação da resposta imunomediada e produção de interferon- α e citocinas pró-inflamatórias ⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾.

Recentemente também foi relatada a ação de HCQ como inibidora da resposta Th17 e conseqüentemente, da liberação de IL-17, IL-6 e IL-22 em portadores de LES e artrite reumatóide, o que sugere novo mecanismo de ação dos antimaláricos ⁽¹¹⁴⁾. Na HAI há relação inversa entre a porcentagem de Tregs e a gravidade da HAI, a com demonstração que os pacientes com HAI apresentam menor número de Tregs ao diagnóstico com aumento da sua população na fase de remissão em vigência de imunossupressão ^(45, 115). Assim, o uso de uma droga como os antimaláricos, que inibem a resposta Th17 e conseqüente diminuição na produção de IL-6, poderia ter um papel no tratamento da HAI, na medida em que produziria aumento numérico das células Tregs.

A Tabela 1 apresenta de forma resumida os principais mecanismos de ação dos antimaláricos nos diferentes componentes do sistema imune. A Figura 2 exemplifica os potenciais mecanismos de ação dos antimaláricos na HAI.

Adaptado de R. Liberal, G. Mieli-Vergani, D. Vergani. Autoimmune hepatitis: From mechanisms to therapy. Rev Clin Esp 2016 ⁽²⁵⁾

Figura 2 - Potenciais mecanismos de ação dos antimaláricos na fisiopatogenia da Hepatite autoimune. As setas vermelhas ilustram a ação dos antimaláricos na diminuição da apresentação de antígenos, produção de Interleucinas 1, 2, 6 e 17, Interferon γ , $\text{TNF}\alpha$ e da atividade das células natural Killer

Tabela 1 - Mecanismos de ação dos agentes antimaláricos

-
- Inibição do processamento e apresentação de antígenos
 - Inibição da liberação de citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- α
 - Inibição da estimulação de receptores do tipo Toll 9
 - Diminuição da atividade das células natural killer
 - Inibição da atividade de linfócitos T citotóxicos e linfócitos T CD4⁺ com auto-reatividade
 - Regulação da apoptose
 - Inibição competitiva de anticorpos anti-DNA
 - Inibição da fosfolipase A2 com diminuição dos níveis de prostaglandinas e leucotrienos
 - Inibição da atividade da protease lisossomal
 - Diminuição da concentração dos receptores de membrana com diminuição da resposta ao estímulo mitogênico
 - Inibição da quimiotaxia de polimorfonucleares
 - Interferência com a síntese proteica
 - Bloqueio de radicais superóxidos
-

Adaptado de Rodriguez-Caruncho C e Marsol IB ⁽⁸⁸⁾

1.6 Efeitos colaterais e tolerância ao uso dos antimaláricos

Em geral, os antimaláricos são bem tolerados e raramente é necessária sua suspensão por eventos adversos. Aparentemente a HCQ apresenta melhor perfil de segurança que o CQ, o que foi demonstrado numa coorte com 940 portadores de doenças reumatológicas (59% AR, 19% LES), 57% em uso de CQ e 43% de HCQ. Os efeitos colaterais foram mais

comuns no grupo que usou CQ (28% X 15%, $p = 0,01$); mas a taxa de suspensão da droga foi de 15%, sem diferenças significativas entre os dois antimaláricos⁽⁹⁸⁾.

Os efeitos colaterais mais frequentes são os gastrintestinais, que ocorrem em cerca de 10-12% dos pacientes, e os mais comuns são náuseas, vômitos e diarreia. Outros sintomas menos frequentemente encontrados são anorexia, queimação retroesternal e distensão abdominal. Raramente pode haver úlceras/sangramento no trato gastrintestinal. Tais efeitos geralmente ocorrem nas primeiras semanas de tratamento, melhoram com o passar do tempo e são minimizados com redução ou fracionamento da dose e administração no período pós-prandial; provavelmente são relacionados com altos níveis sanguíneos da droga^(86, 116).

Outros efeitos colaterais muito comuns são os dermatológicos, que acometem cerca de 3% dos pacientes. As alterações dermatológicas mais comuns são hiperpigmentação cutânea (pigmentação cinza-azulada), prurido, rash (esfoliativo, liquenoide, maculopapular, morbiliforme, urticariforme), angioedema, exacerbação da psoríase, ressecamento da pele, alopecia e embranquecimento capilar. A hiperpigmentação cutânea é mais comum com o CQ do que com HCQ, e acomete principalmente face, antebraços, pernas (região pré-tibial) e palato^(86, 92, 120, 121). Em um estudo caso controle de pacientes com LES e síndrome do anticorpo antifosfolípide (24 casos, 517 controles) que usavam HCQ por uma média de 6,1 anos, as biópsias de pele de cinco casos com lesões pigmentadas revelaram alta concentração de ferro; algumas das lesões melhoraram a despeito da

manutenção da medicação. Nesse estudo houve associação com o surgimento das lesões, independentemente de tratamento prévio, com anticoagulantes orais ou antiagregantes plaquetários e altos níveis de HCQ no sangue ^(121, 122).

O prurido cutâneo pode ocorrer em mais de 40% dos pacientes ^(120, 123), usualmente de 1-3 semanas após o início da droga, com necessidade de sua suspensão em parte dos pacientes (4/46 casos, 8,7%). Erupções cutâneas são de ocorrência mais rara, algumas ocorrem nos primeiros dias e outras mais tardiamente, semanas após início da medicação, sendo indicativas de hipersensibilidade, com contraindicação para manutenção da medicação.

Embora haja descrições de elevações de enzimas hepáticas pelo uso do CQ, esse é um efeito adverso infrequente ⁽¹¹⁷⁾. Nessa situação, cabe o diagnóstico diferencial com causas mais frequentes de elevação de aminotransferases nessa população, entre elas o uso de anti-inflamatórios não esteroides (mesmo que seja por automedicação), drogas potencialmente hepatotóxicas utilizadas simultaneamente para tratamento da doença reumatológica, doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por ganho de peso pelo uso do corticoide e acometimento hepático pela doença de base ^(118, 119). No site internacional do National Institute of Health, dos Estados Unidos, disponível gratuitamente, onde há informações a respeito de lesão hepática induzida por drogas prescritas e não prescritas, ervas e suplementos dietéticos (<http://livertox.nih.gov>), há raras descrições da elevação de enzimas hepáticas com o uso de CQ, mais frequente em

pacientes com porfiria cutânea tarda, em que pode desencadear crise aguda de febre, elevação de enzimas e por fim icterícia (a HCQ só provoca esse tipo de reação quando utilizada em doses muito altas). A ocorrência de reação alérgica ocasionalmente pode ser acompanhada por elevação transitória das enzimas hepáticas.

Os efeitos colaterais oftalmológicos são os mais preocupantes; eles incluem alterações reversíveis como depósitos corneanos, desordens de acomodação e diplopia e são mais comumente encontrados nos usuários de CQ quando comparados com os de HCQ. Os depósitos corneanos cursam de forma assintomática ou podem provocar visão turva e halos em volta de luzes e estão presentes em 90% dos pacientes que usam CQ e 5% daqueles que usam HCQ ^(86, 92, 120). Não há relação entre o depósito corneano e a ocorrência de retinopatia. A complicação mais grave e mais temida, sem dúvida, é a retinopatia pela CQ/HCQ, porque pode ser subdiagnosticada nos estádios precoces e tardiamente, pode levar à perda irreversível da acuidade visual. A prevalência dessa alteração é baixa, particularmente nos primeiros cinco anos de tratamento; entretanto, com o uso prolongado dessa medicação, aumenta para 1% e atinge até 20% após 20 anos de uso ⁽¹²⁴⁾.

Os fatores de risco associados a maior risco de lesão ocular pela CQ/HCQ incluem tempo de uso acima de cinco anos; dose acumulada total acima de 460 g para CQ e acima de 1.000 g para HCQ; dose diária acima de 400 mg/dia para a HCQ (> 6,5 mg/kg/d do peso ideal para indivíduos baixos) e acima de 250 mg/dia para CQ (> 3 mg/kg/d do peso ideal para indivíduos

baixos); idade acima de 60 anos; disfunção hepática ou renal; maculopatia ou doença retiniana pré-existente ⁽¹²⁵⁾. Deve-se ter em mente que o depósito retiniano pode ocorrer mesmo com o uso de doses baixas e por curto período de tempo.

A maculopatia em olho de boi é a lesão encontrada tipicamente fase tardia da toxicidade por CQ/HCQ (Figura 3). É caracterizada por maculopatia com a foveola hiperpigmentada circundada por uma zona anular de hipopigmentação, mesclada com uma fina mobilização pigmentar. Embora a acuidade visual possa ser excelente no início, o paciente habitualmente se queixa de escotomas, faz parte do diagnóstico tardio da lesão pelos antimaláricos, e não há recuperação clínica significativa mesmo com a suspensão da droga. A despigmentação e perda funcional podem progredir por até um ano após a retirada da medicação, o que justifica a importância do diagnóstico precoce em que a suspensão da droga resulta em estabilização, sem perda visual significativa.

De acordo com as recomendações da Academia Americana de Oftalmologia, publicadas em 2016, pacientes em uso de CQ/HCQ devem fazer uma avaliação antes do início ou nos primeiros seis meses de uso da droga para diagnóstico de alterações oftalmológicas pré-existent e para documentar a aparência e estado funcional da retina. Para pacientes de alto risco (vide texto prévio), a triagem anual deve ser iniciada imediatamente após o início da droga, para os outros casos, só é recomendada após cinco anos de uso da medicação ⁽¹²⁵⁾.

A. Retinografia a cores

B. Angiofluoresceinografia

Figura 3 - Maculopatia em olho de boi, resultado do efeito tóxico retiniano dos antimaláricos ⁽¹²⁶⁾

Apesar dos efeitos adversos e reações tóxicas acima descritos, considera-se os antimaláricos sejam drogas geralmente bem toleradas, desde que sejam utilizados na posologia adequada e com acompanhamento regular. São consideradas contraindicações absolutas ao uso de CQ/HCQ hipersensibilidade ou alterações oftalmológicas atribuíveis aos antimaláricos. Os antimaláricos não são contraindicados na gestação, não há evidência de teratogenicidade ou qualquer consequência para o recém-nascido ⁽⁸⁶⁾.

As contraindicações absolutas para seu uso, de acordo com a PDR (Physician's Desk Reference) e FDA (U.S. Food and Drug Administration) incluem alterações retinianas ou de campo visual atribuíveis a qualquer composto 4-aminoquinolina, hipersensibilidade a qualquer composto 4-aminoquinolina (há possibilidade de dessensibilização) e uso por tempo prolongado em crianças. Há recomendações para uso cauteloso em pacientes com doenças psicóticas, epilepsia, pacientes com perda auditiva pré-existente, doenças neuromusculares (como a miastenia gravis), doença hepática e alcoolismo, psoríase e pacientes com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase.

A Tabela 2 apresenta de forma resumida os principais efeitos colaterais decorrentes do uso dos antimaláricos nas doenças autoimunes extra-hepáticas.

Tabela 2 - Efeitos tóxicos não oftalmológicos dos agentes antimaláricos

Incidência	Efeitos colaterais
Comuns	1-20% com CQ/ 1-10% com HCQ; náuseas, vômitos, prurido, rash maculopapular, hiperpigmentação cutâneo-mucosa, insônia, pesadelos, nervosismo
Menos comuns	< 5% com CQ/ <1% com HCQ – alterações vestibulares, zumbidos, neuropatia, psicose, convulsões
Raros	Leucopenia, anemia, porfíria, despigmentação do cabelo, queda capilar, anorexia, diarreia, disfunção hepática

Adaptado de Wallace DJ e cols ⁽¹¹¹⁾

1.7 Uso de antimaláricos nas doenças hepáticas

As primeiras experiências com CQ no tratamento de doenças hepáticas datam da década de 1950, inicialmente para tratamento de abscessos amebianos hepáticos, particularmente nos casos de resistência ao agente mais comumente utilizado na época, a emetina ⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾.

A partir da década de 60 são descritos os primeiros relatos de casos com uso de CQ no tratamento de hepatites crônicas, tanto virais quanto não virais, com melhora clínica dos pacientes ^(130, 131). Em 1986 Kouroumalis e cols. descrevem o uso de CQ 150-450 mg/d no tratamento de sete pacientes com hepatite B crônica ativa AgHBe positivo com seguimento médio de 12 meses, com normalização das enzimas hepáticas, melhora do tempo de protrombina e aumento dos níveis de globulinas. Em três pacientes houve aumento das aminotransferases após a suspensão inadvertida da medicação, com rápida normalização após sua reintrodução. Quatro pacientes foram submetidos à biópsia hepática após um ano da introdução da droga, com achado de cirrose inativa em todos. A droga foi bem tolerada, com poucos efeitos colaterais ⁽¹³²⁾.

Em 1994, Helbling e cols. relataram dois casos de reativação de hepatite B com insuficiência hepática após suspensão da cloroquina, que era administrada para profilaxia de malária e para tratamento de artrite reumatoide. Os autores consideraram que o CQ inibiria a associação de antígenos virais com MHC classe II, inibindo a lise dos hepatócitos infectados mediada pelos linfócitos T e sua suspensão teria provocado um

rebote da resposta imune, com reativação da hepatite B, como acontece nos casos de suspensão de corticoide ⁽¹³³⁾.

Mais recentemente, Ashfaq e cols. descreveram que agentes lisossomotrópicos como o CQ e cloreto de amônio (NH_4Cl) apresentariam efeito antiviral, documentado *in vitro*, ao inibir a endocitose de proteínas virais dependente de pH. O vírus da hepatite C apresenta duas proteínas (E1 e E2) relacionadas à entrada viral no hepatócito por fusão direta com a membrana plasmática e endocitose mediada por receptor. O CQ e o NH_4Cl , sendo bases fracas, penetrariam no lisossomo em sua forma protonada aumentando o pH intracelular e inibindo a endocitose dependente de pH. Após infecção de células hepáticas por pseudopartículas de VHC (genótipos 1a e 3a) na presença de diferentes concentrações de CQ e de NH_4Cl , notou-se redução superior a 50% da infectividade viral. Esses resultados *in vitro* sugeriram possível papel do CQ na inibição da endocitose do VHC no hepatócito, o que poderia tornar essa droga uma opção terapêutica para tratamento da hepatite C ⁽¹³⁴⁾. Em 2016, Peymani e cols. realizaram estudo piloto randomizado, placebo-controlado, em 10 portadores de hepatite C, genótipo 1, não respondedores à terapia dupla com interferon peguilado e ribavirina. Nesse estudo, um grupo recebeu CQ 150 mg/dia e outro placebo por oito semanas, com redução significativa da carga viral no primeiro grupo ($p=0,04$) e posterior elevação após a suspensão da droga ⁽¹³⁵⁾.

Na hepatite autoimune, o CQ foi utilizado na manutenção da remissão da doença após a suspensão do tratamento imunossupressor em 14 pacientes em remissão histológica da HAI (atividade periportal 0 ou 1 de

acordo com a classificação das hepatites crônicas elaborada pelas Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia) que usaram CQ 250 mg/dia por no mínimo um ano ou até recidiva da doença ⁽¹³⁶⁾. Esses pacientes foram comparados com 18 controles históricos, em que a medicação imunossupressora foi suspensa após diagnóstico da remissão histológica. A azatioprina foi suspensa imediatamente e a dose da prednisona foi reduzida 2,5 mg semanalmente até a retirada completa nos dois grupos. Não houve diferenças clínicas, laboratoriais, histológicas e de perfil genético entre os dois grupos ao diagnóstico e à suspensão da imunossupressão. Os pacientes que utilizaram CQ 250 mg/d, receberam a medicação por um tempo médio de 14,1 meses (4-21,3 meses) e apresentaram uma chance de recidiva da doença 6,49 vezes menor que o grupo que suspendeu a imunossupressão e não usou CQ (23,5% X 72,2%; $p = 0,031$). A medicação foi bem tolerada, a maioria dos efeitos colaterais foi relatada no início do tratamento, como náuseas ($n = 5$), cefaleia ($n = 3$), dor epigástrica e turvação visual ($n = 2$), dor nos olhos, tontura, tremores, desconforto abdominal, fadiga e insônia (um paciente cada).

Os quatro pacientes que eram reagentes para o anti-SLA/LP recidivaram, quando comparados com cinco de 10 pacientes que eram negativos para o anti-SLA/LP, mas a diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico (100% X 50%; $p = 0,221$). Oito dos 12 pacientes com HLA DR3 recidivaram comparados com apenas um de cinco com HLA DR4, mas a diferença também não foi significativa (66,6% X 20%; $p = 0,264$). Entretanto, a pesquisa do anti-SLA/LP e do perfil de HLA não foi possível em

todos os pacientes. Em dois pacientes portadores de anti-SLA/LP que recidivaram a doença após a suspensão do CQ, a reintrodução do antimalárico sem uso da imunossupressão habitual (a pedido dos mesmos) resultou em normalização das aminotransferases; as recidivas ocorreram após 85 e 112 dias da suspensão do antimalárico, com ALT= 98U/L e 142U/L (normal até 31U/L) e a normalização das enzimas ocorreu 56 dias após a reintrodução do antimalárico nos dois casos. Esses achados levantaram a suspeita de que talvez a droga tivesse maior benefício no grupo anti-SLA/LP (+), o que não teve confirmação do ponto de vista estatístico.

Essas foram as motivações para a realização do estudo atual. Contudo, embora tenha sido demonstrada a eficácia do antimalárico na diminuição das taxas de recidiva da doença após a suspensão do tratamento imunossupressor, a casuística foi pequena, os pacientes que usaram CQ foram comparados com controle histórico (aumentando o risco de interferência de possíveis fatores confundidores) e pesquisa do anticorpo anti-SLA/LP e do perfil de HLA não foi realizada em todos os pacientes, impossibilitando a identificação de um subgrupo com maior benefício de uso da medicação.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

Avaliar se o difosfato de cloroquina previne a recidiva da HAI em pacientes com remissão histológica da doença, após a suspensão do tratamento convencional.

1.8.2 Objetivos secundários

- a) Verificar se existe um perfil específico de paciente que poderia ter maior benefício com o uso do difosfato de cloroquina;
- b) Avaliar o perfil de segurança do difosfato de cloroquina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse foi um estudo prospectivo, unicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado, em que portadores de HAI em remissão histológica utilizaram CQ ou placebo por até 36 meses para manutenção da remissão bioquímica da doença após a suspensão do tratamento imunossupressor.

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq, identificação 0697/07) (anexo 3) e registrado na base de dados ClinicalTrials.gov (NCT01980745). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado e esclarecido antes da inclusão e o estudo foi realizado de acordo com boas práticas clínicas e a Declaração de Helsinki.

2.1 Critérios para participação no estudo

Foram incluídos pacientes com idade entre 18 e 70 anos, com diagnóstico definitivo de HAI, de acordo com os critérios do Grupo Internacional de HAI ⁽⁴⁾, acompanhados na Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que atingiram resposta completa da doença (normalização bioquímica e histológica) após pelo menos dois anos de tratamento imunossupressor.

Foram excluídos pacientes do sexo feminino gestantes, portadores de síndrome de sobreposição com colangite biliar primária/colangite esclerosante primária e pacientes com doença hepática descompensada. A definição de doença hepática descompensada foi caracterizada pela presença de ascite, encefalopatia hepática, peritonite bacteriana espontânea, hemorragia digestiva alta por hipertensão portal ou classificação como Child B/C conforme Classificação de Child-Turcotte-Pugh ⁽¹³⁷⁾.

Os critérios para interrupção do estudo foram desejo do paciente, gestação durante o seguimento clínico de 36 meses, suspeita de retinopatia ao exame oftalmológico de rotina, ocorrência de efeito colateral graus III/IV em vigência da medicação (conforme a classificação do National Institute of Health/National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events, versão 4,03) ⁽¹³⁸⁾ ou recidiva da hepatite autoimune.

A recidiva da HAI foi definida de acordo com os critérios do GIHA ⁽⁴⁾, como aumento dos níveis de aminotransferases maior ou igual a duas vezes o valor de referência da normalidade, documentado em dois exames, no intervalo durante o qual não se verificou tendência de queda ou estabilização das enzimas hepáticas. Antes da suspensão da droga A/B após recidiva, foi necessária exclusão de outras etiologias para a elevação das enzimas hepáticas, por exemplo, hepatotoxicidade por drogas ou falta de adesão ao tratamento.

2.2 Cálculo do tamanho amostral

A principal hipótese a ser comprovada era se havia diferença nas taxas de recidiva da HAI entre os grupos que usaram CQ e placebo para manutenção da remissão bioquímica após suspensão do tratamento imunossupressor. As taxas de recidiva foram estimadas de acordo com os resultados encontrados em estudo-piloto ⁽¹³⁶⁾, em que foram comparados 14 pacientes tratados com CQ com 18 controles históricos (tamanho amostral de 32 pacientes), em que a taxa de recidiva no grupo que usou CQ foi de 23,5% comparado com 72,2% de recidiva no controle histórico que suspendeu a imunossupressão após remissão histológica e ficou sem medicação.

Assumindo uma taxa de inclusão de 7 pacientes/ano, foi definido pelo teste exato de Fisher que um tamanho amostral de 31 pacientes permitiria estimar uma diferença mínima detectável de 37% com nível de confiança maior ou igual a 95% e poder estatístico de pelo menos 80%.

2.3 Protocolo de tratamento

Em relação ao tratamento inicial da HAI, seguiu-se o protocolo de condutas do serviço, em que a indução da remissão é realizada preferencialmente com a associação de azatioprina e prednisona e, no caso de contraindicações ao uso de azatioprina, com prednisona em monoterapia (Figura 4). O tratamento foi iniciado com prednisona 30 mg/dia e azatioprina

50 mg/dia durante o primeiro mês. No segundo mês, fez-se redução da dose de prednisona para 20 mg/dia e manutenção da dose da azatioprina em 50 mg/dia. Mensalmente realizou-se a redução do corticoide (20 → 15 → 10 mg/dia) e ajustou-se a dose da azatioprina de forma a induzir a remissão bioquímica, ou seja, a normalização dos níveis de aminotransferases. A dose máxima utilizada de azatioprina foi de 2 mg/kg/dia e de prednisona 15 mg/dia. Em casos de efeitos colaterais ao tratamento ou ausência de resposta ao tratamento inicial, foram utilizadas outras opções de tratamento, entre elas, ciclosporina ou tacrolimus e micofenolato mofetil (nunca em monoterapia). Após um ano de tratamento imunossupressor, em geral, nos casos de aumento de GGT maior ou igual a cinco vezes o limite superior da normalidade, com manutenção de aumentos discretos de aminotransferases (<3 vezes o limite superior da normalidade), foi associado ácido ursodesoxicólico ao tratamento, na dose de 600 a 900 mg/dia (dose máxima de 15 mg/kg/dia). Não foi considerada obrigatória a realização de biópsia hepática ou de exames colangiográficos antes da introdução desse medicamento para descartar lesão biliar, visto que os pacientes não apresentavam dados clínicos sugestivos de colestase e, na maioria das vezes, apresentavam biópsia no período pré-tratamento sem evidências de lesão biliar. Após normalização das enzimas hepáticas por 18 meses consecutivos e pelo menos dois anos de tratamento imunossupressor, foi realizada biópsia hepática para definição de remissão histológica.

A remissão histológica foi definida conforme preconizado em literatura como atividade mínima ou ausente na biópsia (índice de atividade

histológica <4) ⁽⁸⁾ ou atividade periportal 0 ou 1, de acordo com os critérios da Sociedade Brasileira de Patologia - anexo 4) ⁽¹³⁹⁾. Foram consideradas satisfatórias as biópsias hepáticas com pelo menos 1cm de tamanho ou ao menos 8 espaços-porta. No caso de atividade periportal maior que 1, foi aumentada a dose das medicações anteriormente mencionadas até se atingir os limites de doses estabelecidos ou foi adicionada outra medicação. Após 18 meses de mudança do regime terapêutico foi realizada nova biópsia hepática para avaliar a presença de remissão histológica.

Após detecção da remissão histológica e assinatura do termo de consentimento livre e informado, o paciente foi randomizado de forma aleatória (sorteio) e duplo-cego para receber CQ 250 mg/dia ou placebo (droga A ou B). A droga foi manipulada pelo setor de Farmácia do HC-FMUSP e as informações sobre a constituição dos comprimidos foram mantidas sob sigilo até a finalização do estudo. A opção pelo uso do CQ (e não HCQ) foi feita por ser a formulação disponível para dispensação pela Farmácia do HCFM-USP quando o estudo foi idealizado e iniciado.

No primeiro mês, o paciente recebeu o esquema imunossupressor que induziu a remissão histológica em associação a droga A ou B. A partir do segundo mês, foi realizada a suspensão imediata da azatioprina e reduções semanais de 2,5 mg da dose da prednisona até sua completa suspensão. Após esse período, a medicação (droga A ou B) foi mantida até a recidiva da HAI ou, na ausência da recidiva, até que o paciente completasse três anos de uso da medicação ou optasse por abandonar o estudo (Figura 4).

Nos casos de remissão histológica em uso de ácido ursodesoxicólico, essa medicação não foi suspensa na manutenção da remissão histológica com droga A ou B. Nesses casos o paciente fez uso de droga A ou B associada ao ácido ursodesoxicólico durante todo o tempo de participação do estudo, já que o mecanismo exato de ação da droga na HAI ainda não está bem estabelecido e não foi possível descartar completamente a presença de componente biliar justificando seu uso e a melhora laboratorial por ele induzida.

Figura 4 – Protocolo de tratamento do estudo

2.4 Protocolo de seguimento durante o estudo

Todos os pacientes foram submetidos a consultas periódicas pelo menos a cada 30 dias nos primeiros seis meses após introdução da droga, sendo coletados exames bioquímicos e hematológicos de rotina. Após os primeiros seis meses, o paciente vinha às consultas médicas a cada dois ou três meses, conforme os níveis de enzimas hepáticas e ocorrência ou não de efeitos colaterais até completar os três anos do estudo. Os exames coletados em cada consulta foram enzimas hepáticas, hemograma completo, sódio, potássio, ureia, creatinina, glicemia de jejum. Pelo menos anualmente também foram coletados eletroforese de proteínas séricas e autoanticorpos. Os pacientes cirróticos realizaram exame ultrassonográfico de abdômen total e dosagem de alfafetoproteína a cada seis meses e os não cirróticos, exame ultrassonográfico de abdômen total anual.

Os pacientes foram atendidos por médicos que não participaram do estudo e as consultas foram revisadas e a conduta médica definida pelo pesquisador principal. Foram anotadas todas as queixas e a evolução dos sintomas para posterior comparação. Em caso de ocorrência de efeitos colaterais, a droga foi suspensa por solicitação do paciente ou por orientação médica.

Foi realizada avaliação oftalmológica inicial, seguida de avaliações preferencialmente semestrais (ao menos anual) em todos os pacientes, independentemente do tipo de medicamento administrado. No caso de alterações sugestivas de oftalmopatia pelo CQ a droga foi imediatamente

suspensa. Após o término do tratamento, os pacientes continuaram a realizar essas avaliações pelos próximos cinco anos, devido ao risco de surgimento tardio da retinopatia mesmo após a suspensão da droga. Todos os pacientes eram encaminhados ao oftalmologista como se estivessem usando CQ, independentemente se estivessem em uso de droga A ou droga B.

2.5 Tipagem HLA

A pesquisa do HLA foi realizada durante o seguimento do estudo, com amostras de DNA extraídas na admissão do paciente para seguimento inicial no ambulatório e conservadas à -20°C e, quando necessária, a extração foi feita pela técnica DTAB/CTAB ⁽¹⁴⁰⁾. Para a reação de amplificação dos genes HLA-DR e DQ foram utilizados iniciadores específicos para polimorfismo no éxon 2. A presença do alelo ou grupo de alelos foi baseada na presença ou ausência do produto amplificado. A determinação de alelos ou grupo de alelos de Classe II foi feita pela técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*), com kit comercial. As placas *Micro SSP™ HLA DNA Typing* contêm conjunto de *primers* liofilizados de sequência específica para amplificação dos alelos HLA de Classe II dos *primers* 5' e 3' de controle interno, que são *primers* que amplificam uma região gênica não polimórfica (AMP A e AMP B), funcionando como controle positivo da reação. A reação foi realizada seguindo-se as orientações do fabricante do kit. Após a reação de PCR, o produto amplificado foi aplicado

em gel de agarose 2,5%. As amostras foram submetidas à corrente de 140-150 volts, 80 mA por 5 minutos. Posteriormente este gel foi fotografado e analisado. A nomenclatura utilizada foi a do equivalente sorológico segundo o sistema de HLA, incluindo genes expressos e pseudogenes utilizando a padronização estabelecida no consenso do *WHO Nomenclature Committee*.

2.6 Pesquisa dos autoanticorpos

2.6.1 Imunofluorescência indireta – foi feita a pesquisa do ANA tendo como substrato células HEp2 fixadas obtidas comercialmente e do ASMA, anti-LKM1, anti-LC1 e AMA usando cortes realizados em criostato, não fixados de estômago, rim e fígado. Os títulos da reatividade foram considerados a partir de 1/40 de acordo com os critérios do Grupo Internacional de Hepatite Autoimune ⁽⁷⁾.

2.6.2 ELISA – o anti-SLA/LP foi pesquisado pela kits comerciais Quanta Lite™ SLA (INOVA Diagnostic Inc; San Diego CA, USA) e/ou Anti-SLA/LP IgG (EUROIMMUN, Luebeck, Alemanha).

2.7 Avaliação dos efeitos colaterais

Os dados sobre efeitos colaterais eram questionados e anotados no prontuário médico por médicos que não participaram do estudo. Os dados anotados correspondiam à data de início e término dos sintomas, gravidade

e necessidade de medidas invasivas/não invasivas para controle dos mesmos. Após o término do estudo os prontuários médicos foram revisados e a relação de causalidade entre o uso da droga e o evento adverso foi estabelecida de acordo com os critérios do Algoritmo de Naranjo ⁽¹⁴¹⁾. Esse algoritmo determina a probabilidade de que uma reação adversa ao fármaco seja realmente devida à droga e não resultado de outros fatores. A probabilidade foi estabelecida de acordo com uma pontuação como definida, provável, possível ou duvidosa.

A classificação da gravidade do evento adverso foi feita em conformidade com os critérios do CTCAE versão 4.03 (Common Terminology Criteria for Adverse Events), desenvolvido pelo National Cancer Institute (NCI) e National Institutes of Health (NIH) norte-americano ⁽¹³⁸⁾.

2.8 Análise estatística

A sobrevida livre de recidiva foi definida como o período entre a inclusão do paciente e o final do tratamento (36 meses) ou o surgimento de efeitos colaterais de forma que o paciente fosse retirado do estudo e considerado uma censura. Tempo para recidiva foi definido como o intervalo de tempo entre a suspensão da imunossupressão e a recidiva bioquímica da doença.

As curvas de sobrevida livre de recidiva foram estimadas pelo método de Kaplan Meyer e comparadas pelo teste Log-Rank. As razões de risco e seus respectivos intervalos de confiança 95% foram estimados por

regressão simples de Cox. Na regressão múltipla foram avaliadas co-variáveis clinicamente relevantes para recidiva, incluindo sexo, idade ao diagnóstico da HAI, positividade dos anticorpos antiactina e anti-SLA/LP, perfil de HLA (DR3, DR13), níveis de gamaglobulina na inclusão, fibrose avançada (F3/F4 conforme classificação de METAVIR para fibrose) na biópsia que documentou a remissão histológica antes da inclusão no estudo.

Para investigar o subgrupo com maior benefício, as interações entre a droga e reatividade de autoanticorpos e perfil de HLA foram analisadas por regressão múltipla de Cox. A proporcionalidade dos riscos foi testada utilizando os resíduos de Schoenfeld. As variáveis categóricas foram avaliadas por meio do teste exato de Fisher e as variáveis contínuas pelo teste Mann-Whitney ou pelo t-test conforme indicado. As hipóteses de normalidade e homocedasticidade foram avaliadas pelos testes de Anderson-Darling ⁽¹⁴²⁾ e Levene ⁽¹⁴³⁾, respectivamente. Os testes de hipóteses consideraram um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. O programa utilizado para todos os cálculos foi o R, versão 3.0.2 (R Core Team, 2013).

3 RESULTADOS

3 RESULTADOS

Foram incluídos 61 pacientes no período de 15/05/2002 a 21/10/2011 e o acompanhamento clínico foi realizado até 2016. Foram incluídos 62 pacientes em remissão bioquímica e histológica da HAI para receber CQ (droga A, n=31) ou placebo (droga B, n=30) por 36 meses. Com exceção de um paciente no grupo placebo, que recusou o tratamento imediatamente após a randomização e foi excluído da análise estatística, todos os pacientes receberam o tratamento para o qual foram randomizados (Figura 5).

a) Para a análise estatística foram incluídos todos os pacientes que foram submetidos à randomização, independentemente da suspensão precoce por efeitos colaterais ou perda de seguimento, exceto o paciente que recusou a participar do estudo ainda durante a consulta da randomização.

Figura 5 - Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo

A idade média ao diagnóstico da HAI foi de $29,9 \pm 17,4$ anos. O tempo médio de tratamento da HAI antes da suspensão da imunossupressão foi de $5,9 \pm 4,05$ anos. O tempo médio de uso de cloroquina ou placebo foi de 517 ± 453 dias, mediana de tempo de uso de 325 dias (22-1.275 dias). O tempo médio de seguimento foi de 3.526 ± 1.233 dias.

Os achados clínicos, laboratoriais e histológicos dos pacientes da casuística estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados clínicos, laboratoriais e histológicos dos pacientes da casuística geral

Parâmetros	N (%)
Distribuição por gênero (feminino/masculino)	53:9
Idade (anos) na inclusão (média $\pm$ DP)	$38,4 \pm 16,4$
Tipos de HAI	
Hepatite autoimune tipo 1	55 (90,1)
Hepatite autoimune tipo 2	1 (1,6)
HAI tipo 3 (anti-SLA/LP ^a isolado)	2 (3,2)
HAI sem marcador	3 (4,9)
Positividade do anti-SLA/LP ^b	14 (23,3)
Positividade do anticorpo antimicrofilamentos ^b	27 (47,3)
Fibrose avançada ao diagnóstico (E3/E4) ^b	41 (73,2)
Fibrose avançada na inclusão do estudo (E3/E4) ^e	34 (56,6)
Randomização da droga	
Droga A (difosfato de cloroquina)	31
Droga B (placebo)	30

a) anti-SLA/LP - anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado pâncreas; b) em 60 pacientes c) em 57 pacientes d) estadiamento conforme consenso das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia em 56 pacientes e) Estadiamento conforme consenso das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia em 60 pacientes porque em um paciente a amostra foi inadequada para estadiamento da fibrose, sendo considerada satisfatória para estadiamento da atividade inflamatória periportal.

Ao comparar os pacientes que receberam CQ com aqueles que receberam placebo, não houve diferenças clínicas, laboratoriais e histológicas significativas entre os dois grupos no momento da randomização, conforme demonstrado na Tabela 4. Também não houve diferença no tempo de tratamento antes da suspensão da imunossupressão entre os dois grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos dados clínicos, laboratoriais e histológico dos pacientes que receberam cloroquina e placebo

Parâmetros	Cloroquina n = 31 (%)	Placebo n = 30 (%)	p
Gênero feminino n (%)	26 (83,9)	26 (86,7)	1
Idade (anos) ao diagnóstico da doença (média ± DP)	29,4 ± 17,9	30,5 ± 17,1	0,98
Tipo de Hepatite autoimune			0,27
Hepatite autoimune tipo 1	29 (93,5)	26 (86,7)	
Hepatite autoimune tipo 2	1 (3,2)	0 (0)	
Hepatite autoimune tipo 3 (anti-SLA/LP isolado) ^ε	1 (3,2)	1 (3,3)	
HAI- sem marcador	0 (0)	3 (10)	
Anti-SLA/LP n(%) ^b	6 (20)	8 (26,7)	0,76
Anticorpo antimicrofilamentos n (%)	11 (37,9)	16 (55,2)	0,29
Cirrose hepática ao diagnóstico ^c	14 (50)	18 (64,3)	0,42
Fibrose avançada na inclusão do estudo (E3/E4) ^d	18 (58)	16 (53,3)	0,8
Hipertensão arterial sistêmica	3 (9,7)	5 (16,7)	0,47
Diabetes mellitus (%)	4 (13)	5 (16,7)	0,73
Imunossupressão na remissão histológica			
Azatioprina (média ± DP – mg/dia)	90,7 ± 26,6	97,5 ± 22,1	0,47
Prednisona (média ± DP – mg/dia)	8,5 ± 2,8	8,9 ± 2,1	0,8
Níveis normais de gamaglobulina na inclusão % ^e	20 (64,5)	23 (76,7)	0,40
Tempo de tratamento antes da suspensão da imunossupressão (anos)	6 ± 4,5	5,8 ± 3,5	0,85

a) anti-SLA/LP - anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado pâncreas; b) Em 60 pacientes c) Em 56 pacientes; estadiamento conforme consenso das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia d) em 60 pacientes porque em um paciente a amostra foi inadequada para estadiamento da fibrose, sendo considerada satisfatória para estadiamento da atividade inflamatória periportal; e) Valor dentro da faixa de normalidade (gamaglobulina ≤ 1,5g/dl e Imunoglobulina G ≤ 1538mg/dl)

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo que usou CQ e o que usou placebo no que se refere ao perfil de HLA, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil de HLA-DR e HLA-DQ nos pacientes da casuística e conforme o uso de cloroquina ou placebo

Perfil HLA	Casuística completa n = 61	Grupo cloroquina n = 31	Grupo Placebo n = 30
DR1	6 (9,8)	4 (12,9)	2 (6,7)
DR3	26 (42,6)	11 (35,5)	15 (50) ^a
DR4	17 (27,9)	6 (19,3)	11 (36,7) ^b
DR7	13 (21,3)	5 (16,1)	8 (26,7) ^c
DR8	1 (1,6)	0 (0)	1 (3,3)
DR9	2 (3,3)	2 (6,4)	0 (0)
DR10	1 (1,6)	1 (3,2)	0 (0)
DR11	6 (9,8)	4 (12,9)	2 (6,7)
DR13	26 (42,6)	16 (51,6)	10 (33,4) ^d
DR14	5 (8,2)	4 (12,9)	1 (3,3)
DR15	7 (11,5)	3 (9,7)	4 (13,3)
DR16	5 (8,2)	3 (9,7)	2 (6,7)
DQ02	28 (45,9)	14 (45,1)	14 (46,7)
DQ04	7 (11,5)	2 (6,4)	5 (16,7)
DQ05	15 (24,6)	10 (32,2)	5 (16,7)
DQ06	28 (45,9)	16 (51,6)	12 (40) ^e
DQ07	7 (11,5)	4 (12,9)	3 (10)
DQ08	11 (18)	6 (19,3)	5 (16,7)

a) p = 0,3; b) p = 0,16; c) p = 0,36; d) p = 0,2; e) p = 0,44

Embora não tenham sido observadas diferenças clínicas, laboratoriais e histológicas entre o grupo que usou CQ e o que usou placebo para a manutenção da remissão bioquímica após a suspensão da imunossupressão, observou-se que o grupo que usou CQ, quando comparado ao grupo que recebeu placebo, apresentou maior percentual de finalização do estudo e maior tempo de ingestão da droga (Tabela 6).

Em relação à resposta ao tratamento, a sobrevida livre de recidiva da HAI durante o uso de CQ foi significativamente maior quando comparada ao grupo que usou placebo, (59,3 X 19,9%, $p = 0,039$) (Tabela 6). Não houve diferenças significantes no valor de aminotransferases na recidiva entre quem usou CQ ou placebo ($212,6 \pm 161$ U/l X $301,9 \pm 356$ U/l respectivamente; $p = 0,44$) (valor de referência = 31 U/l).

Tabela 6 - Resposta do uso do difosfato de cloroquina na manutenção da remissão na hepatite autoimune

	Cloroquina n = 31	Placebo n = 30	p
Estudo completo n (%)	12 (38,7)	4 (13,3)	0,04
Tempo (dias) de ingestão da droga (média $\pm$ DP)	$616 \pm 484,8$	$386 \pm 377,4$	0,043
Recidiva da doença após suspensão da imunossupressão	40,7%	80,1%	0,039

Após a suspensão da medicação ao término do estudo, cinco de 12 (41,6%) pacientes do grupo CQ apresentaram recidiva da doença, comparado com nenhum paciente do grupo placebo (0/4). Após a suspensão da medicação ao término do estudo, a sobrevida livre de recidiva em seis meses para o grupo CQ foi de 60% (IC 95%: 42% - 86%) enquanto para o grupo Placebo foi 100% (valor $p = 0,03$) (Figura 6).

Figura 6 – Recidiva da doença após a suspensão do tratamento depois de três anos de uso de difosfato de cloroquina ou placebo

Na regressão simples de Cox, os fatores que se associaram com a recidiva da HAI foram uso da droga A (difosfato de cloroquina), positividade do anticorpo anti-SLA/LP, presença do HLA DR3 e DR8, conforme demonstrado na Tabela 7. A idade ao diagnóstico da HAI, a presença de fibrose avançada ao diagnóstico ou na biópsia realizada antes da inclusão no estudo para comprovação da remissão histológica, bem como níveis normais de gamaglobulina na inclusão do estudo não se associaram com o risco de recidiva (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise de fatores associados a recidiva da hepatite autoimune pela regressão simples de Cox

Variável analisada	Razão de risco (intervalo de confiança)	Valor p
Droga B (placebo)	2,51 (1,19 - 5,25)	0,015
Anti-SLA/LP ^a	2,84 (1,34–5,98)	0,006
HLA DR 3	2,04 (1,0 – 4,16)	0,049
HLA DR8	15,84 (1,75 – 143,03)	0,014
HLA DR4	2,02 (0,96 – 4,27)	0,066
HLA DQ6	0,53 (0,25 – 1,1)	0,089
HLA DR13	0,63 (0,3 – 1,31)	0,21
HLA DR7	0,77 (0,32 – 1,89)	0,57
Anticorpo antimicrofilamentos	1,24 (0,61 – 2,54)	0,55
Tipo de hepatite autoimune ^{b,c}		
Hepatite autoimune tipo 2	0 (0 – inferior)	0,997
Hepatite autoimune tipo 3	0,26 (0,04 – 1,93)	0,19
Hipertensão arterial sistêmica	1,76 (0,61 – 5,08)	0,29
Diabetes mellitus	0,38 (0,09 – 1,58)	0,18
Idade ao diagnóstico da hepatite autoimune	1 (0,98 – 1,02)	0,71
Cirrose hepática ao diagnóstico	0,71 (0,34 – 1,49)	0,36
Fibrose avançada (F3/4) na biópsia da RH ^d	1,09 (0,54 – 2,24)	0,8
Níveis normais de gamaglobulina na inclusão do estudo ^e	1,14 (0,51 – 2,56)	0,74

a) anti-SLA/LP - anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado pâncreas b) HAI - hepatite autoimune; c) avaliação do risco de recidiva conforme a classificação da HAI em tipos 1, 2 e 3, considerando HAI-1 o grupo de referência para comparação; d) RH = remissão histológica; e) gamaglobulina $\leq$ 1,5g/dl e Imunoglobulina G $\leq$ 1538mg/dl

Nas Figuras 7 a 9, encontram-se os gráficos que analisam a sobrevida livre de recidiva nos grupos CQ versus placebo de acordo com a reatividade do anticorpo anti-SLA/LP, uso de CQ e perfil de HLA DR3.

Figura 7 - Recidiva da hepatite autoimune de acordo com a reatividade do anticorpo anti-SLA/LP pela regressão simples de Cox

Figura 8 – Recidiva da hepatite autoimune conforme o uso de difosfato de cloroquina ou placebo pela regressão simples de Cox

Figura 9 – Recidiva da hepatite autoimune de acordo com o perfil de HLA DR3 pela regressão simples de Cox

Na regressão múltipla de Cox, os fatores que se associaram a maior risco de recidiva da HAI foram o uso de placebo e a positividade do anticorpo anti-SLA/LP, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise de fatores associados à recidiva da hepatite autoimune pela regressão múltipla de Cox

Variáveis analisadas	Razão de risco (intervalo de confiança)	Valor p
Droga B (placebo)	2,4 (1,05- 5,5)	0,039
Reatividade do anticorpo anti-SLA/LP ^a	5,4 (1,91-15,3)	0,002
Sexo masculino	3,13 (0,89-10,94)	0,074
Idade ao diagnóstico	1 (0,98-1,03)	0,998
Biópsia pré inclusão F3/4	2,18 (0,93-5,14)	0,075
Reatividade do anticorpo antiactina	1,28 (0,49-3,33)	0,608
Níveis de gamaglobulina dentro do valor de referência na inclusão ^b	0,54 (0,2-1,45)	0,225
Perfil de HLA DR3	1,84 (0,73-4,63)	0,193
Perfil de HLA DR13	0,9 (0,29-2,79)	0,86

a) anti-SLA/LP: anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado pâncreas; b) gamaglobulina $\leq 1,5\text{g/dl}$ e Imunoglobulina G $\leq 1538\text{mg/dl}$

Considerando os pacientes com anti-SLA/LP negativo e manutenção com cloroquina como grupo referência (grupo com menor risco de recidiva), o modelo de regressão múltipla de Cox poderia ser interpretado da seguinte forma: os pacientes que são anti-SLA/LP negativo e receberam placebo apresentaram risco de recidiva 2,4 vezes maior do que o grupo referência. Para os pacientes com anti-SLA/LP positivo e manutenção com CQ, o risco de recidiva foi 5,4 vezes maior do que os pacientes do grupo referência.

Na investigação de um subgrupo de maior benefício com uso da medicação, observa-se que dos quatorze pacientes que apresentavam

reatividade para o anti-SLA/LP, oito usaram placebo e seis CQ. Três dos seis que usaram CQ recidivaram a doença comparados com todos os que usaram placebo (50% X 100%, $p = 0,055$).

O grupo anti-SLA/LP(+) apresentou níveis significativamente mais elevados de aminotransferases na recidiva quando comparados ao grupo anti-SLA/LP (-) (460 ± 429 U/l X 165 ± 120 U/l; $p = 0,048$) (valor de referência da normalidade até 31U/l). Entretanto, quando foi avaliado o nível das aminotransferases na recidiva dos pacientes anti-SLA/LP (+) ($n=11/14$, 8 recidivas no grupo placebo e 3 no grupo CQ), observamos que os pacientes que usaram CQ tiveram níveis de aminotransferases mais baixos do que aqueles que usaram placebo, mas essa diferença não foi significativa (CQ = $243,3 \pm 183$ U/l X placebo = 541 ± 475 U/l, $p = 0,33$).

Quando se tentou estabelecer a interação entre a droga e a positividade do anticorpo anti-SLA/LP, não houve significância estatística, com razão de risco = 2,17 (CI:0,57-8,23); $p = 0,254$. Também não se conseguiu identificar um subgrupo com maior benefício quando se considerou o perfil de HLA, tipo de HAI e positividade do anticorpo antiactina (Tabela 9).

Tabela 9 – Análise do uso de difosfato de cloroquina em subgrupos específicos de pacientes com HAI

Variáveis analisadas	Razão de risco (intervalo de confiança)	Valor p
Reatividade do anticorpo anti-SLA/LP ^a	1,41 (0,28 – 7,03)	0,67
Reatividade do anticorpo antiactina	3,82 (0,75 – 19,38)	0,10
HLA DR3	0,87 (0,2 – 3,86)	0,85
HLA DR4	0,98 (0,17 – 5,76)	0,98
HLA DR7	0,49 (0,07 – 3,24)	0,46
HLA DR13	0,89 (0,19 – 4,13)	0,89
HLA DQ2	1,1 (0,25 – 4,84)	0,9
HLA DQ6	1,49 (0,32 – 6,93)	0,61

a) anti-SLA/LP: anticorpo antiantígeno hepático solúvel/fígado pâncreas

Na avaliação do perfil de segurança do CQ, observou-se que no grupo CQ 17 pacientes (54,8%) apresentaram efeitos colaterais decorrentes do uso da medicação, e foi necessária sua suspensão em seis (19,3%). Os sintomas responsáveis pela suspensão da CQ foram prurido ($n = 1$), convulsão ($n = 1$), prurido intratável ($n = 1$), neuropatia ($n = 2$), piora de função renal ($n = 1$).

Quando se avaliou a causalidade entre a reação adversa ao medicamento e a droga pelo algoritmo de Naranjo, observou-se que na maioria dos casos, a relação de causalidade foi possível (Tabela 10).

Tabela 10 – Causalidade entre a reação adversa ao Medicamento e a droga conforme definições do Algoritmo de Naranjo no grupo que usou difosfato de cloroquina

Classificação no algoritmo de Naranjo	Reação Adversa ao Medicamento
Definida	0
Provável	dermatite descamativa (1), neuropatia (1), prurido (1), piora de função renal (1)
Possível	Cefaleia (2), convulsão (1), náusea (1), hiperpigmentação (3), prurido (4), retinopatia (1), pápulas cutâneas (1), inapetência (1), neuropatia (1)
Duvidosa	mialgia (1)

Os efeitos colaterais mais comumente encontrados estão expostos na Tabela 11. Não houve efeitos colaterais graves (graus 3 / 4). A maioria dos efeitos colaterais foi transitória e/ou controlada com uso de sintomáticos, sem comprometimento significativo da qualidade de vida.

Tabela 11 - Efeitos colaterais apresentados pelos pacientes de acordo com os critérios do CTCAE, versão 4,03

Evento adverso	Cloroquina (n=31) n (%)	Placebo (n = 30) n (%)
Qualquer evento adverso	17 (54,8)	5 (16,7)
Suspensão por efeitos colaterais	6 (19,3)	3 (10)
Grau 3 / 4	0	0
Grau 2		
Neuropatia	2 (6,4)	0
Dermatológicos	6 (19,3)	2 (6,6)
Convulsão	1 (3,2)	0
Artralgia	0	1 (3,3)
Grau 1		
Cefaleia	2 (6,4)	1 (3,3)
Piora de função renal	1 (3,2)	0
Dispepsia	3 (9,7)	0
Mialgia	1 (3,2)	0
Dermatológicos	3 (9,7)	0
Retinopatia	1(3,2)	1 (3,3)

No grupo CQ, os efeitos colaterais mais frequentes foram dermatológicos, incluindo prurido sem lesões cutâneas ($n = 5$), hiperpigmentação cutânea ($n = 3$), pápulas pruriginosas ($n = 1$) e dermatite semelhante àquela encontrada na pelagra (deficiência de niacina) com melhora após reposição de vitamina B3 ($n = 1$). A suspensão da droga só foi necessária em um caso de prurido cutâneo intratável; nos outros casos houve controle sintomático com uso de anti-histamínicos, uso de fotoprotetor e hidratação da pele. No grupo que usou placebo, um paciente apresentou lesões eritematosas com prurido cutâneo e um prurido cutâneo sem lesões dermatológicas, não sendo necessária a suspensão da droga.

Uma paciente que usou CQ era portadora de epilepsia e estava bem controlada, sem crises convulsivas por mais de três anos. Vinte dias após a introdução da medicação apresentou um episódio de convulsão durante uso irregular da medicação anticonvulsivante. Como havia casos relatados de convulsões desencadeadas por cloroquina em paciente com LES^(144, 145), foi optado pela suspensão da medicação.

Uma paciente que usou CQ evoluiu com piora da função renal; apresentava alterações de eletrólitos (hipomagnesemia, hipocalemia) e alcalose metabólica antes da introdução da medicação. Iniciou CQ com creatinina de 1,09 (clearance estimado de 47,3 mL/min/1,73m²). Compareceu em consulta 21 dias após início de uso da droga com potássio de 6,6 mEq/L e creatinina de 1,41 mg% (clearance estimado de 36,6 mL/min/1,73m²) coincidentemente com aumento da dose de espironolactona pela nefrologia. O diurético teve sua dose reduzida com melhora dos

exames laboratoriais. Durante seguimento clínico voltou a apresentar nova elevação de creatinina para 1,85 (clearance estimado de 27,9 mL/min/1,73m²), com evidências ultrassonográficas de doença renal crônica, sendo o CQ finalmente suspenso sob orientação da nefrologia. Após suspensão do CQ, a paciente teve queda dos níveis de creatinina, que se mantiveram estáveis entre 1,4 e 1,7 mg%. Posteriormente teve diagnóstico de síndrome de Gitelman (doença genética de caráter autossômico recessivo), que cursa com disfunção renal.

Em relação aos casos de neuropatia periférica, uma das pacientes apresentou perda de força muscular e dor em membros inferiores, bilateralmente, principalmente à direita, com limitação da movimentação e redução da força muscular (grau IV ao exame físico), 10 meses após início do CQ. No estudo de condução motora apresentou redução das amplitudes dos potenciais de ação dos nervos fibulares e tibiais. Na avaliação neurológica houve suspeita de que o quadro fosse decorrente do uso de CQ, e a medicação foi suspensa 30 dias após o início dos sintomas, com reversão completa do déficit. O segundo caso de neuropatia ocorreu em paciente que iniciou com queixa de parestesias em mãos e dores osteoarticulares disseminadas após seis meses do início da droga. O estudo eletroneuromiográfico evidenciou polineuropatia sensitivo-motora de padrão mielínico comprometendo difusamente os quatro membros de grau leve e neuropatia distal do nervo mediano bilateral (síndrome do túnel do carpo). Os sintomas reverteram após suspensão da droga. Não houve descrição de casos de neuropatia no grupo que usou placebo.

Em dois pacientes do grupo CQ e um do grupo placebo, foram detectadas alterações no fundo de olho, sem perdas visuais, sendo sugerida a suspensão da medicação em uso, pela probabilidade de efeito colateral ser secundário ao uso de CQ. No grupo CQ a detecção da alteração ocular ocorreu após 35 meses e 19 meses de uso da droga e houve regressão completa no exame oftalmológico de controle. No grupo placebo, a detecção ocorreu após 24 meses de uso da droga, com manutenção de halo de atrofia peripapilar e mácula normal ao exame oftalmológico de controle após três anos da suspensão da medicação.

4 DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Esse é um estudo duplo cego e randomizado com 61 pacientes com HAI em remissão completa da doença, que evidenciou que a cloroquina foi segura e eficaz em reduzir de forma significativa o risco de recidiva da doença em 2,51 vezes (80,1% para 40,7%) no período de três anos após a suspensão do tratamento imunossupressor. No entanto, não foi possível indicar um subgrupo de maior benefício com o uso da medicação.

Em relação à metodologia, no estudo atual, procuramos eliminar possíveis vieses de estudos prévios que pudessem interferir nas taxas de recidiva da HAI após suspensão do tratamento imunossupressor. Nos critérios de inclusão do estudo, todos os pacientes incluídos tinham pelo menos 18 meses de enzimas hepáticas normais e no mínimo dois anos de tratamento imunossupressor antes da randomização/tentativa de suspensão da imunossupressão, conforme preconizado pelo GIHAI ⁽⁸⁾. De acordo com dados publicados, 87% dos pacientes que atingem a remissão sustentada da doença apresentam exames laboratoriais normais antes da suspensão da imunossupressão ⁽¹⁴⁶⁾. Em estudo publicado em 2001 ⁽¹⁴⁷⁾ com 103 pacientes com HAI foi evidenciado 75% de recidiva após a suspensão do tratamento depois de pelo menos um ano de remissão bioquímica e clínica da doença. Os pacientes recidivantes e aqueles que permaneceram em remissão sustentada diferiram em relação ao tempo de tratamento, sendo que os que recidivaram tinham sido tratados por menor período de tempo ($26,7 \pm 14,6$

meses $X 48,6 \pm 23,9$ meses, $p < 0,05$). Na análise de subgrupo, os pacientes tratados continuamente por mais de quatro anos apresentaram probabilidade de 67% de remissão sustentada sem tratamento, comparado com 17% naqueles tratados por 2-4 anos e apenas 10% naqueles tratados por 1-2 anos. Em nosso estudo todos os pacientes tinham transaminases normais na inclusão e a média de tempo de tratamento antes da suspensão da imunossupressão foi de cerca de 6 anos. Antes da suspensão do tratamento todos os pacientes tiveram documentação da remissão histológica por biópsia hepática. Embora estudo prévio tenha evidenciado que níveis de ALT abaixo da metade do valor de referência da normalidade com níveis de IgG abaixo de 1.200 mg/dl sejam altamente preditivos de ausência de recidiva da doença após suspensão do tratamento mesmo sem confirmação histológica da remissão da doença ⁽⁶⁵⁾, foi optado pela confirmação histológica da remissão porque cerca de 55% dos pacientes com enzimas hepáticas e níveis de IgG normais ainda apresentam hepatite de interface na biópsia e apresentam recidiva da doença em caso de suspensão do tratamento ⁽⁶⁴⁾. Entretanto, há que se considerar que mesmo a histologia normal antes da suspensão do tratamento não afasta por completo o risco de recidiva da doença, já que mesmos pacientes com resolução histológica podem recidivar a doença ^(65, 66).

A farmacocinética da droga exigiu alguns cuidados na metodologia. Como o metabolismo da droga é primariamente hepático, envolvendo enzimas do citocromo P450, na randomização incluímos apenas cirróticos com função hepática preservada para minimizar o risco de ocorrência de

efeitos colaterais/ ineficácia da medicação por possíveis prejuízos no metabolismo da droga relacionados à disfunção hepática. Outro cuidado foi manter a imunossupressão que induziu a remissão histológica em associação ao CQ durante o primeiro mês após randomização, porque a droga só atinge concentrações séricas estáveis após 4-6 semanas^(101, 103-106) e apresenta ampla e lenta distribuição tecidual, em volume aparentemente grande. Um segundo motivo para a manutenção da associação no início do estudo foi diminuir o risco de confundir possíveis alterações enzimáticas relacionadas à retirada da imunossupressão com hepatotoxicidade pelo antimalárico, pelo menos no primeiro mês de introdução da nova medicação. Embora o metabolismo seja feito pelas enzimas do citocromo P450, as interações medicamentosas mais significativas incluem antibióticos, colestiramina, bloqueadores do receptor H2 (particularmente cimetidina), imipramina, ciclosporina, metoprolol, metotrexato, amitriptilina, fluoxetina (Lexi-InteractTM Online), drogas que não foram utilizadas pelos nossos pacientes.

Em relação à padronização do antimalárico, embora em literatura a HCQ provoque menos efeitos colaterais que o CQ nos pacientes com doenças reumatológicas, a cloroquina é 2-3 vezes mais potente que a HCQ⁽¹⁰²⁾ e era a única opção de antimalárico disponível para dispensação pela farmácia pública do nosso hospital, motivo pelo qual foi escolhida para uso no estudo.

Os grupos foram uniformes em relação às principais características clínicas, bioquímicas, histológicas e genéticas relacionadas ao risco de

recidiva da doença. Os fatores associados com menor risco de recidiva como idade ≥ 18 anos ao diagnóstico ⁽⁶⁹⁾, etnia japonesa ⁽⁷⁰⁾, progressão para cirrose durante o tratamento ^(148, 149), ausência de doenças autoimunes concomitantes ⁽⁶⁶⁾, normalização completa dos níveis de aminotransferases ^(146, 148) e de IgG ^(148, 150) e atividade mínima ou ausente com ausência de plasmócitos na biópsia hepática de controle antes da suspensão da imunossupressão ^(72, 148). A presença de cirrose hepática e a gravidade da atividade histológica ao diagnóstico não parecem ter relação com o risco de recidiva da doença nos estudos mais recentes ⁽⁶⁸⁾. A idade ao diagnóstico da HAI, a porcentagem de cirrose hepática e fibrose avançada (Metavir F3/4) ao diagnóstico e na biópsia pré-inclusão no estudo foram semelhantes entre os dois grupos. Ainda que nem todos os pacientes tivessem níveis normais de gamaglobulina (64,5% no grupo CQ e 76,7% no grupo placebo), todos pacientes apresentavam enzimas hepáticas normais e atividade histológica mínima ou ausente na biópsia hepática de controle antes da inclusão no estudo.

A positividade dos anticorpos anti-SLA/LP ⁽²¹⁾ e do antiLKM-1 ^(151, 152) se associa com maior risco de recidiva, e alguns autores recomendam o tratamento imunossupressor por toda vida nesses subgrupos de pacientes. Estudo ilustrando experiência de 20 anos com o tratamento de HAI na infância ⁽¹⁵¹⁾ evidenciou que a positividade do anti-LKM1 (20/52 pacientes) se associou com maior chance de evolução para óbito ou transplante hepático na análise univariável. Nos 13 pacientes que atingiram critérios para suspensão do tratamento, apenas quatro eram portadores de anti-LKM1 e a

suspensão do tratamento resultou em recidiva em todos, num tempo médio de dois meses. Em nossa casuística havia apenas um caso de HAI-2 no grupo CQ, o que impossibilitou maiores conclusões a respeito da recidiva nesse subgrupo. Essa paciente permaneceu três anos com o CQ e após cerca de 90 dias de sua suspensão, apresentou recidiva bioquímica (AST = 197 [31 UI/L], ALT = 531 [31 UI/L]. Em relação ao anti-SLA/LP, em nossa casuística, o anticorpo foi encontrado em 23,3% da casuística, com taxas semelhantes às descritas em outros estudos (~20-30%)^(11, 17, 153), com positividade semelhante nos grupos CQ (20%) e placebo (26,7%).

O efeito benéfico do CQ contra a recidiva da doença pode ser evidenciado em vários achados do estudo. Os pacientes que usaram a medicação terminaram mais frequentemente o estudo que aqueles que usaram placebo (38,7 X 13,3%) e utilizaram a droga por período de tempo maior (616 ± 484,8 dias X 386 ± 377,4 dias) que aqueles que usaram placebo. Além disso, após a suspensão da droga ao término do estudo, a recidiva no grupo CQ foi significativamente maior que no grupo placebo (41,6% X 0%), mostrando que o CQ estava de fato protegendo os pacientes contra a recidiva. A sobrevida livre de recidiva foi de 59,3% no grupo cloroquina e 19,9% no placebo e essa diferença também foi significativa. Ao examinar outras publicações, as taxas de recidiva encontradas são muito variáveis, um dos motivos é a falta de conceito uniforme de recidiva (aumentos acima de duas ou três vezes o limite superior da normalidade) e a população estudada. Em geral, 50-90% dos pacientes apresentam recidiva da doença após a suspensão da imunossupressão^(8, 9, 25, 57), a maioria delas

dentro do primeiro ano após a suspensão da medicação. Uma análise retrospectiva multicêntrica com 131 pacientes em que o tratamento foi suspenso evidenciou que a perda da remissão/recidiva ocorreu quase que universalmente, com mais de 80% de recidiva e necessidade de retratamento dentro de três anos ⁽⁶⁶⁾.

As opções terapêuticas para a manutenção sustentada da remissão da doença são escassas, incluindo monoterapia com azatioprina 2 mg/kg/dia (com retirada gradual e lenta da prednisona) ^(8, 74, 154, 155), corticosteroides em monoterapia na menor dose possível com manutenção de remissão bioquímica ou combinação de azatioprina e doses baixas de corticoides ^(8, 74, 154, 155). Além de escassas, essas opções se associam com risco de efeitos colaterais e aumento do risco de neoplasias, o que justifica a busca por novas terapias. Dez a 30% dos pacientes apresentam efeitos colaterais relacionados ao corticoide (principalmente estéticos), com necessidade de ajuste da dose ou suspensão do tratamento. Em relação à azatioprina, eventos adversos graves ocorrem em aproximadamente 25%, com suspensão da droga em 10% e necessidade de ajuste da dose em outros 10-20% ⁽¹⁵⁶⁾. Cerca de 6% daqueles que utilizam azatioprina 2 mg/kg/dia por tempo prolongado evoluem com supressão medular (e o risco é maior em pacientes cirróticos com hiperesplenismo), e 32% necessitam ajuste da dose por efeitos colaterais ⁽¹⁾. Além disso, o uso de tiopurinas associa-se a aumento do risco de infecções oportunistas bacterianas e fúngicas e neoplasias, na HAI foram encontradas particularmente neoplasias hepatobiliares, linfomas não Hodgkin e cânceres de pele não-melanoma ⁽¹⁵⁷⁻

¹⁵⁹⁾. Esse maior risco foi evidenciado também em outras doenças autoimunes como doença inflamatória intestinal e doenças reumatológicas. Nesse contexto, o uso de uma terapia imunomodulatória e não imunossupressora para manutenção de remissão da HAI poderia ser benéfico.

Pode-se argumentar que 59,3% ainda é uma baixa sobrevida livre de recidiva, quando comparada à manutenção do tratamento imunossupressor por toda a vida. Por outro lado devem ser considerados os riscos de infecções oportunistas e de neoplasias relacionados ao uso crônico de imunossupressores, assim como oferecer uma nova opção àqueles que apresentam efeitos colaterais/não toleram a imunossupressão habitual. Outro aspecto a se considerar, é o rigor que tivemos em alguns aspectos do nosso estudo, como na definição da recidiva da doença como elevação acima de duas vezes o limite superior da normalidade (e não três vezes), conforme proposto nos guidelines iniciais do GIHA¹ ⁽⁴⁾, o que provavelmente aumentou as taxas de diagnóstico de recidiva da doença.

Outro rigor foi na suspensão do tratamento por efeitos colaterais. Mesmo não tendo certeza da real associação entre o uso da droga e a ocorrência dos efeitos colaterais, muitas vezes o tratamento foi suspenso por essa droga ainda não ser oficial no tratamento da HAI. A taxa de suspensão por efeito adverso foi de 19,3% no grupo CQ, o que pode ter influenciado os resultados finais, já que nenhum desses pacientes havia recidivado quando ainda estavam em uso da medicação e todos recidivaram após a sua suspensão. Outro possível fator confundidor, que não foi avaliado de forma

rigorosa no trabalho, foi a adesão ao tratamento. Embora se questionasse em cada consulta e fosse solicitada a devolução do frasco com comprimidos restantes ao fim de cada consulta, não se pode garantir com segurança a taxa de adesão de cada paciente. Além disso, essa taxa de recidiva encontrada, foi em três anos, período no qual o paciente permaneceu sem os efeitos colaterais do uso do corticoide, com possibilidade de ganhos secundários no perfil metabólico e na densidade óssea, como já documentado nas doenças reumatológicas autoimunes.

Na análise univariável, os fatores relacionados ao maior risco de recidiva foram o uso de placebo, a positividade do anti-SLA/LP e o perfil HLA-DR3 e HLA-DR8. A positividade do anti-SLA/LP associa-se ao perfil de HLA DR3 e já está associada à doença de pior prognóstico, com achados histológicos mais graves, maiores taxas de recidiva após suspensão do tratamento, maior evolução para óbito e transplante hepático e maior recidiva no pós-transplante ^(11, 12, 160, 161). Em estudo de metanálise em que se avaliaram as implicações prognósticas do anti-SLA/LP na HAI, observou-se que pacientes com positividade desse anticorpo, são mais frequentemente portadores de HLA-DR3 e apresentam risco de recidiva após suspensão do tratamento imunossupressor duas vezes maior (OR 2,24, 95%CI 1,38 – 3,64; $p = 0,001$).

O perfil de HLA determina diferentes formas de apresentações clínicas e diferentes respostas ao tratamento. A hipótese mais aceita é que a sequência de aminoácidos decodifica genes específicos, determina a conformação da fenda que liga antígenos na molécula MHC classe II, que

está expressa nas células apresentadoras de antígenos (como linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e outras) determinando sua habilidade em reconhecer novos epitopos e deflagrar a resposta imune via ativação de linfócitos T auxiliar, CD4 com perfil específico de secreção de citocinas, o que resulta em resposta autoimune de maior ou menor gravidade. Pacientes caucasóides portadores de HLA-DR3 apresentam doença de início mais precoce e mais agressiva, com pior resposta ao tratamento com corticosteróides quando comparados aos pacientes com HLA-DR4, predominante na raça japonesa ^(8, 54, 69, 162-165). No Brasil, a susceptibilidade à HAI tipo 1 está associada primariamente ao HLA DR13, e com o DR3 nos que são HLA DR13 negativo. A susceptibilidade à HAI tipo 2, está relacionada ao HLA DR7 e secundariamente ao HLA DR3 ⁽²⁷⁾. No estudo atual, a HAI-1 correspondeu a 90,1% dos pacientes desse estudo e a presença dos HLAs DR3 e DR13 foi encontrada individualmente em 42,6% dos pacientes (26/61), enquanto o HLA DR4 foi presente em 27,9% e o HLA DR7 em 21,3%, sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos CQ e placebo. Um estudo norte-americano, em que se avaliaram 26 pacientes com HAI não relacionados aos HLA DR3/DR4 (13% casuística, 54% de positividade para HLA DR13), evidenciou que os pacientes cujo único marcador de susceptibilidade era o HLA DR13 apresentaram menores taxas de recidiva após a suspensão do tratamento que os pacientes cujo único marcador de susceptibilidade foi o HLA DR3 (50% X 85%, $p=0,05$) ⁽¹⁶⁶⁾. Esses achados são semelhantes aos encontrados em nosso estudo, em que a presença do HLA DR3 se associou a maior risco de recidiva. O achado de

que a positividade do HLA DR8 se associou a maior risco de recidiva da HAI foi um viés estatístico, visto que apenas um paciente era portador de HLA DR8 no grupo placebo, com recidiva da doença, o que não permite a extrapolação desse achado. Em relação ao HLA-DQ, os dois perfis de HLA-DQ mais frequentemente encontrados em nossa casuística foram o DQ2 e DQ6, encontrados cada um deles em 45.9% dos pacientes. Esse achado é semelhante à achados prévios em pacientes brasileiros e argentinos com HAI-1, em que foi observada associação da doença com a positividade dos HLA-DR13 e DQ6 ^(27, 28). A presença do HLA-DQ6 resultou em tendência de menor risco de recidiva ($p=0.089$), com razão de risco de 0,53; o que deve ser confirmado em estudos com maior tamanho amostral: seria efeito protetor relacionado ao HLA-DQ6 ou à presença do HLA-DR13? Em estudo brasileiro prévio, foi observado aumento significativo no DQB1*06 (68% X 41% nos controles; $p=0.00007$) em forte desequilíbrio de ligação com DRB1*13 ⁽²⁷⁾. Na casuística atual, dos 28 pacientes com HLA-DQ6, 22 deles possuíam pelo menos um alelo DR13 (78,5%), que como mencionado anteriormente, se associou à menor risco de recidiva da doença quando comparado ao HLA-DR3 em pacientes norte-americanos. Apesar da grande influência genética na expressão da doença e na resposta ao tratamento, na regressão múltipla de Cox os únicos fatores que mantiveram relação com recidiva foram uso de placebo e a positividade do anti-SLA/LP.

Como sabidamente os portadores de anti-SLA/LP apresentam maior chance de recidiva, tentou-se avaliar se o CQ teria maior benefício nesse subgrupo. Considerando apenas os pacientes com positividade para o anti-

SLA/LP (n=14), a taxa de recidiva foi maior no grupo placebo que no CQ (100% X 50%), entretanto essa diferença não atingiu significância estatística. Quando avaliamos os níveis de transaminases na recidiva, observamos que os pacientes que utilizaram placebo atingiram valores mais altos que aqueles que usaram CQ e, mais uma vez, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($541 \pm 475 \text{ U/l}$ X $243,3 \pm 183 \text{ U/l}$, $p=0,33$). Quando foi avaliada a interação entre o antimalárico e o subgrupo anti-SLA/LP(+) por regressão de Cox, também não houve interação significativa. Essas diferenças não foram significativas devido ao pequeno tamanho amostral (erro tipo 2) e o benefício do uso da CQ no subgrupo anti-SLA/LP(+) merece ser melhor avaliado em estudos com maior número de pacientes. Também não foi possível estabelecer um maior benefício com uso de CQ nos pacientes com HLA DR3, apesar do maior risco de recidiva quando comparados aos portadores de HLA DR4 e DR13^(15, 23, 26, 166).

Em relação aos efeitos colaterais, as porcentagens de ocorrência e suspensão por efeitos colaterais provavelmente estão superestimadas, pois fomos muito rígidos na atribuição de qualquer novo sintoma durante o tratamento, mesmo sem ter clara relação entre o sintoma e o uso da medicação. De acordo com a classificação de Naranjo, nenhum dos efeitos colaterais apresentados no grupo CQ teve sua causalidade com a droga classificada como definida, na maioria dos casos (n = 12) a relação de causalidade foi possível. Por conseguinte, foi observado no estudo maior incidência de efeitos colaterais quando comparado com a literatura, mas não foi encontrado nenhum efeito colateral classificado como graus 3 e 4

conforme a classificação do CTCAE. Os efeitos colaterais mais frequentemente descritos em literatura, que ocorrem em 1-20% dos usuários de CQ, são sintomas dispépticos (diarreia, náuseas, vômitos e perda de peso), prurido cutâneo, rash máculo-papular, hiperpigmentação cutâneo-mucosa ^(86, 88), que foram justamente os efeitos colaterais mais freqüentes nos pacientes desse estudo. Os efeitos colaterais dermatológicos foram os mais frequentes na casuística atual e incluíram prurido, hiperpigmentação cutânea e rash, ocorrendo em 29% dos usuários de CQ. A ocorrência da hiperpigmentação cutâneo-mucosa, que ocorre em 10-30% dos casos, e ocorre mais frequentemente em face, antebraços, pernas e palato é reversível em 2-6 meses após a suspensão do tratamento, devido a descamação regular das células da pele ⁽¹⁶⁷⁾. É mais frequente com o uso de CQ do que com HCQ ^(86, 88, 102, 121), o que pode ser um viés no atual estudo. Ainda assim, a hiperpigmentação aconteceu em apenas 3 (9,6%) casos, e foi reversível após a suspensão do tratamento. O prurido cutâneo, que pode ocorrer em até 40% dos pacientes com necessidade de suspensão em cerca de 9% ⁽¹²³⁾, ocorreu em 7 pacientes (22%), com suspensão do CQ em apenas um caso. Na maioria das vezes, o quadro dermatológico foi revertido com uso de antihistamínicos e hidratação, sem prejuízo da qualidade de vida do paciente. Em relação aos efeitos colaterais secundários ao uso de corticoides, observam-se alterações tais como equimoses, acne, hirsutismo, estrias, fácies em lua cheia, depósito de gordura na região dorsal e pescoço e ganho de peso podem ocorrer em até 80% dos pacientes após dois anos de tratamento com a medicação ^(1, 9). Pela falta de opções terapêuticas e

pelo uso regular e universal do corticoide na HAI, fica a impressão que fomos mais tolerantes a essa medicação do que ao antimalárico.

Em frequência, os efeitos colaterais mais comumente encontrados foram os dispépticos, que são mais comuns nas primeiras semanas de tratamento, normalmente melhoram com o passar do tempo e são minimizados com a redução ou fracionamento da dose e com a administração pós-prandial ^(86, 88), o que não foi possível em nenhum nesse experimento, pois o modelo do experimento e a formulação da medicação em drágeas não permitiam o seu fracionamento.

Efeitos colaterais menos comuns e podem ocorrer em até 5% dos usuários de CQ tais como convulsão e neuromiopia ⁽⁸⁸⁾, ocorreram em um e dois pacientes respectivamente e, como mencionado anteriormente, a relação exata entre o sintoma e o uso da droga não ficou definitivamente comprovada (rever descrições no item resultados). A convulsão ocorreu associada ao uso irregular dos anticonvulsivantes. A neuromiopia é evento raro, com poucas descrições em literatura ^(86, 88, 168, 169). Estudo recente com 532 portadores de LES e lúpus cutâneo descreveu quatro casos de neuropatia periférica (0,8%), mas não há descrições dos sintomas apresentados ⁽¹⁶⁹⁾. Os dois casos que tivemos de neuropatia ocorreram após curto tempo de uso da droga, após seis e dez meses, o que costuma ser incomum e, em um dos casos, a despeito da suspensão da droga, o diagnóstico neurológico posteriormente confirmado foi de síndrome do Túnel do Carpo, mas a paciente teve melhora do quadro álgico após a suspensão da droga.

Em relação à retinopatia, ela ocorreu em um caso no grupo CQ e em um no grupo placebo; não houve perdas visuais. A lesão retiniana pelo antimalárico costuma ser irreversível, é dose e tempo dependente ⁽¹²⁴⁾. Alguns fatores de risco identificados para sua ocorrência são dose acumulada total de 460 g ou dose diária acima de 250 mg de CQ (ou maiores que 3 mg/kg/dia para os indivíduos de baixo peso), idade acima de 60 anos, disfunção hepática ou renal, maculopatia ou doença retiniana pré existente ^(125, 170, 171). No caso da paciente com CQ, a idade era de 50 anos, a suspeita da lesão ocorreu 19 meses após o início da medicação, a dose por peso era de 2,84 mg/kg/dia e não havia disfunção renal ou hepática. Após a suspensão da droga, houve reversão completa da lesão suspeita em menos de seis meses de seguimento oftalmológico. Vale lembrar que, assim como os antimaláricos, o uso de corticosteroides por longo prazo também se associa a risco visual, tais como glaucoma e catarata, e deve também ser recomendada avaliação oftalmológica periódica nos pacientes que usam a medicação por longo período ^(1, 8, 9).

Algumas críticas podem ser tecidas a esse trabalho, como a redução do tamanho amostral pela suspensão precoce do antimalárico após a ocorrência de alguns dos efeitos colaterais (mesmo sem a documentação bem definida da relação de causalidade com a droga) e após a ocorrência das gestações (embora a droga seja considerada segura na gestação). Essas decisões foram tomadas pelos pesquisadores pelo uso inovador dos antimaláricos no tratamento da HAI. A avaliação da curva de sobrevida livre de recidiva pelo método de Kaplan Meyer minimizou essa ocorrência, já que

o paciente pode ser observado até sua censura no estudo (suspensão da droga).

O longo período de inclusão no estudo, que foi de nove anos, também pode contribuir para a influência de fatores externos no estudo; por exemplo, após alguns anos de estudo, os pacientes que usavam droga B começaram a questionar e comentar entre si a maior taxa de recidiva quando comparados aos usuários da droga A e esses comentários podem ter tido influência na adesão ao tratamento e na taxa de aceitação para participação do estudo. Além disso, ao longo dos anos, os efeitos colaterais dos antimaláricos foram sendo mais bem conhecidos, por exemplo, no momento da idealização do estudo não havia descrição de convulsões desencadeadas pelos antimaláricos, e a presença de epilepsia não foi considerada inicialmente como critério de exclusão para participação do estudo. A Sociedade Americana de oftalmologia só realizou a padronização do screening oftalmológico para os antimaláricos a cada cinco anos em 2011, quando o estudo já estava quase completo. Entretanto, esse longo tempo de inclusão se justificou pela baixa incidência/prevalência da doença e pelo fato do estudo ter sido unicêntrico, o que por sua vez, também possibilitou melhor controle de outros fatores confundidores que poderiam influenciar nossos resultados, tais como a graduação da atividade inflamatória nas biópsias hepáticas antes da inclusão, a padronização dos exames coletados e dos critérios para suspensão da medicação, bem como do seguimento após o término do estudo.

Concluindo, o CQ reduziu de forma segura e significativa o risco de recidiva da HAI em remissão após a suspensão do tratamento imunossupressor; seu efeito parece ser mais benéfico nos pacientes portadores do anticorpo anti-SLA/LP, mas essa relação ainda precisa ser comprovada em estudo com maior tamanho amostral. Os efeitos colaterais apresentados foram leves e controlados na maioria das vezes com uso de sintomáticos, sem prejuízos na qualidade de vida dos pacientes. A grande inovação desse estudo foi revelar a possibilidade de usar uma droga sem efeito imunossupressor como parte do tratamento da HAI, criando a expectativa, em longo prazo, da formulação de outras drogas com ação imunomoduladora que possam ser úteis no manejo da doença, o que possibilitaria a ampliação do escasso arsenal terapêutico atualmente disponível.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- 5.1 O difosfato de cloroquina diminuiu de forma significativa, quando comparado ao placebo, o risco de recidiva bioquímica da HAI em remissão histológica, após a suspensão do tratamento imunossupressor;
- 5.2 Embora a ocorrência de efeitos colaterais tenha sido frequente nos pacientes que usaram difosfato de cloroquina, a maioria dos efeitos colaterais foi transitória ou controlada com uso de medicações;
- 5.3 A droga foi considerada segura no que se refere à ocorrência de eventos adversos graves no período do estudo de três anos, tal como a retinopatia;
- 5.4 Não foi possível definir um perfil específico de pacientes com maior benefício ao uso da cloroquina conforme a positividade dos autoanticorpos e perfil de HLA DR e DQ, ainda que se tenha vislumbrado efeito mais favorável nos pacientes com reatividade para o anti-SLA/LP.

6 ANEXOS

6.1 Anexo 1 - Sistema de escore revisado para o diagnóstico de HAI de acordo com o Grupo Internacional de Hepatite auto-imune ⁽⁹⁾

Parâmetros	Escore
Sexo feminino	+2
Fosfatase Alcalina: AST/ALT (número de x acima do normal)	
< 1,5	+2
1,5-3,0	0
> 3,0	-2
Globulinas, Gamaglobulinas ou IgG (número de x acima o normal)	
>2,0	+3
1,5-2,0	+2
1,0-1,5	+1
<1,0	0
Auto-anticorpos (títulos pela IFI, em cortes de ratos)	
Adultos: ANA, AAML, AAMFR-1	
>1/80	+3
1/80	+2
1/40	+1
< 1/40	0
Antimitocôndria	-4
Marcadores Virais	
Anti-VHA IgM, AgHBs ou anti-HBc IgM positivo	-3
Anti-VHC e RNA do VHC positivo	-3
Anti-VHA IgM, AgHBs, anti-HBc IgM ou anti-VHC negativos	+3
História de uso recente de drogas hepatotóxicas positiva/negativa	-4/+1
Consumo alcoólico: < 25g/dia/ > 60g/dia	+2/-2
Outra doença auto-imune no paciente ou em familiar de primeiro grau	+2
Histologia: Hepatite de Interface	+3
Rosetas	+1
Infiltrado inflamatório acentuado e predominantemente de plasmócitos	+1
Nenhuma das alterações acima	-5
Alterações biliares sugestivas de CBP e CEP	-3
Outra alteração sugestiva de outra etiologia	-3
Auto-anticorpos auxiliares em pacientes com ANA, AAML ou AAMFR-1 negativos	
Antiantígeno hepático solúvel, anticitosol hepático tipo 1, antifígado e pâncreas, antiproteína específica hepática, anti-receptor de asialoglicoproteína, antiantígeno de membrana plasmática de hepatócito humano ou antifração glicosíngolípídea da membrana plasmática de hepatócito: positivo/negativo	+2/0
HLA DR3 ou DR4 em caso de negatividade para os auto-anticorpos (pode ser adaptado a variações geográficas)	+1
Resposta Terapêutica	
Completa/Recidiva durante ou depois da retirada do tratamento após resposta completa Inicial	+2/+3
Diagnóstico definitivo:	
antes do tratamento	>15
após o tratamento	>17
Diagnóstico provável:	
antes do tratamento	10-15
após o tratamento	12-17

6.2 Anexo 2 - Critérios simplificados para o diagnóstico de HAI ⁽⁶⁾

Parâmetros		Escore
ANA ou AML	1/40	+ 1
ANA ou AML	1/80	+ 2
Anti LKM1	≥ 1/40	+ 2
Anti-SLA	Positivo	+ 2
Imunoglobulina G	> 1 x valor normal	+ 1
	> 1,1 x valor normal	+ 2
Histologia	Compatível	+ 1
	Típica	+ 2
Sorologias virais	Negativa	+ 2
Diagnóstico Definitivo		≥ 7
Diagnóstico Provável		≥ 6

6.3 Anexo 3 - Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq)

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao Departamento de
GASTROENTEROLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 27/11/2013, que o protocolo da Pesquisa nº 0697/07, intitulado **“ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO CEGO COM CLOROQUINA NA MANUTENÇÃO DE REMISSÃO DA HEPATITE AUTO-IMUNE”**, será TESE DE DOUTORADO da aluna Debora Raquel B. Terrabuio, tendo como orientador o **Prof. Dr. Flair José Carrilho**.

São Paulo, 27 de Novembro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0697/07

Título: ESTUDO RANDOMIZADO, DUPLO CEGO COM CLOROQUINA NA MANUTENÇÃO DE REMISSÃO DA HEPATITE AUTO-IMUNE

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Flair José Carrilho

Pesquisador Executante: Dra. Debora Raquel B. Terrabuio

Departamento: GASTROENTEROLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 27/11/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 13/05/2013 - Mudança de pesquisador responsável para Prof. Dr. Flair José Carrilho**

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 466/12, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 27 de Novembro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

6.4 Anexo 4 - Classificação das hepatites crônicas baseada em critérios de semiquantificação, conforme consenso das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia ⁽¹³⁹⁾

1. alterações estruturais:

- 0- normal
- 1- expansão fibrosa de espaço-porta
- 2- expansão fibrosa portal com septos porta-porta
- 3- preservação parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, podendo ser visto esboço de nódulos
- 4- cirrose

2. infiltrado inflamatório portal (atividade portal):

- 0- raros linfócitos portais
- 1- aumento discreto dos linfócitos portais
- 2- aumento moderado dos linfócitos portais
- 3- aumento acentuado dos linfócitos portais
- 4- aumento muito acentuado dos linfócitos portais

3. Atividade periportal:

- 0- ausência de lesões
- 1- extravasamento de linfócitos para a interface (*spill over*), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados
- 2- necrose em saca-bocados discreta
- 3- necrose em saca-bocados moderada
- 4- necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços porta

4. Atividade parenquimatosa:

- 0- hepatócitos normais
- 1- alterações discretas dos hepatócitos
- 2- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitários em numerosos sítios
- 3- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitários em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluenta
- 4- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitários em numerosos sítios, associada à necrose confluenta extensa/múltipla.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Czaja AJ, Freese DK; American Association for the Study of Liver Disease. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2002;36(2):479-97.
2. Cançado ELR, Porta G. Autoimmune hepatitis in South America. In: Manns M, Paumgartner G, Leuschner U, editors. *Immunology and Liver*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2000. p. 82-92.
3. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International autoimmune hepatitis group. *Hepatology*. 1993;18(4):998-1005.
4. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999;31(5):929-38.
5. Cancado ELR, Abrantes-Lemos CP, Terrabuio DRB. The importance of autoantibody detection in autoimmune hepatitis. *Front Immunol*. 2015;6:222.
6. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48(1):169-76.
7. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cançado EL, MacKay IR, Manns MP, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol*. 2004;41(4):677-83.

8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol*. 2015;63(4):971-1004.
9. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2010;51(6):2193-213.
10. Ballot E, Homberg JC, Johanet C. Antibodies to soluble liver antigen: An additional marker in type 1 auto-immune hepatitis. *J Hepatol*. 2000;33(2):208-15.
11. Baeres M, Daehrich C, Schlumberger W, Galle PR, Lohse AW, Herkel J, et al. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: Specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut*. 2002;51(2):259-64.
12. Vergani D, Dürr R, Lopes AR, Bogdanos DP, Okamoto M, Ma Y, et al. Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology*. 2002;35(3):658-64.
13. McFarlane IG. Autoimmune hepatitis: diagnostic criteria, subclassifications, and clinical features. *Clin Liver Dis*. 2002;6(3):605-21.
14. Thiele DL. Autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis*. 2005;9(4):635-46.
15. Liberal R, Vergani D, Mieli-Vergani G. Review article: update on autoimmune hepatitis. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3(1):42–52.
16. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun*. 2013;46:17-24.

17. Manns M, Kyriatsoulis A, Gerken G, Staritz M, Meyer KH, Büschenfelde Z. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet*. 1987;1(8528):292-4.
18. Bernal W, Ma Y, Smith HM, Portmann B, Wendon J, Vergani D. The significance of autoantibodies and immunoglobulins in acute liver failure: A cohort study. *J Hepatol*. 2007;47(5):664-70.
19. Czaja AJ. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis: current status and future directions. *Gut Liver*. 2016;10(2):177-203.
20. Kanzler S, Weidemann C, Gerken G, Löhr HF, Galle PR, Meyer zum Büschenfelde KH, et al. Clinical significance of autoantibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999;31(4):635-40.
21. Chen ZX, Shao JG, Shen Y, Zhang J, Hua Y, Wang LJ, et al. Prognostic implications of antibodies to soluble liver antigen in autoimmune hepatitis: a PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(23):e953.
22. Czaja AJ, Donaldson PT, Lohse AW. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(2):413-9.
23. Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S132-44.
24. Czaja AJ. Current concepts in autoimmune hepatitis. *Ann Hepatol*. 2005;4(1):6-24.

25. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis: From mechanisms to therapy | La hepatitis autoinmune: de los mecanismos al tratamiento. *Rev Clin Esp.* 2016;216(7):372-83.
26. Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougin B, Cançado ELR, Porta G, Carrilho F, et al. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: Identifying the major susceptibility locus. *Hum Immunol.* 2001;62(2):165-9.
27. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(7):1906-13.
28. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, et al. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology.* 1999;30(6):1374-80.
29. Czaja AJ, Bianchi FB, Carpenter HA, Krawitt EL, Lohse AW, Manns MP, et al. Treatment challenges and investigational opportunities in autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2005;41(1):207-15.
30. Nakamura K, Yoneda M, Yokohama S, Tamori K, Sato Y, Aso K, et al. Efficacy of ursodeoxycholic acid in Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13(5):490-5.
31. Miyake Y, Iwasaki Y, Kobashi H, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, et al. Efficacy of ursodeoxycholic acid for Japanese patients with autoimmune hepatitis. *Hepatol Int.* 2009;3(4):556-62.

32. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado ELR, Porta G, Goldberg AC, et al. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol.* 2002;37(3):302-8.
33. Arndtz K, Hirschfield GM. The pathogenesis of autoimmune liver disease. *Dig Dis.* 2016;34(4):327-33.
34. Tagle Arrospide M, Leon Barua R. [Viral hepatitis A as a triggering agent of autoimmune hepatitis report of a case and review of literature]. *Rev Gastroenterol Peru.* 2003;23(2):134-7.
35. Rigopoulou EI, Smyk DS, Matthews CE, Billinis C, Burroughs AK, Lenzi M, et al. Epstein-barr virus as a trigger of autoimmune liver diseases. *Adv Virol.* 2012;2012:987471.
36. Mouelhi L, Debbeche R, Salem M, Bouzaidi S, Mekki H, Houissa F, et al. Infection à cytomégalo virus révélatrice d'une hépatite auto immune de type 1. *Tunis Med.* 2010;88(9):674-7.
37. Laskus T, Slusarczyk J. Autoimmune chronic active hepatitis developing after acute type B hepatitis. *Dig Dis Sci.* 1989;34(8):1294-7.
38. Magrin S, Craxi A, Fabiano C, Fiorentino G, Almasio P, Palazzo U, et al. Hepatitis C virus replication in "autoimmune" chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1991;13(3):364-7.
39. Vento S, Cainelli F, Renzini C, Concia E. Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance. *Lancet.* 1997;350(9087):1298-9.
40. Al-Hamoudi WK. Severe autoimmune hepatitis triggered by varicella zoster infection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(8):1004-6.

41. Robertson DAF, Guy EC, Zhang SL, Wright R. Persistent measles virus genome in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet*. 1987;330(8549):9-11.
42. Kalland KH, Endresen C, Haukenes G, Schrumpf E. Measles-specific nucleotide sequences and autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet*. 1989;1(8651):1390-1.
43. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa JI, Kaneko K, Watanabe K, et al. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:968549.
44. Zhao L, Qiu DK, Ma X. Th17 cells: The emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *J Dig Dis*. 2010;11(3):126-33.
45. Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One*. 2011;6(4):e18909.
46. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and-yet-unanswered questions. *Autoimmun Rev*. 2015;14(2):105-16.
47. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life*. 2015;67(2):88–97.
48. Herkel J. Regulatory T cells in hepatic immune tolerance and autoimmune liver diseases. *Dig Dis*. 2015;33 Suppl 2(suppl 2):70-4.

49. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol.* 2004;41(1):31-7.
50. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, et al. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol.* 2012;57(1):125-32.
51. Longhi MS, Hussain MJ, Kwok WW, Mieli-Vergani G, Ma Y, Vergani D. Autoantigen-specific regulatory T cells, a potential tool for immune-tolerance reconstitution in type-2 autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2011;53(2):536-47.
52. Longhi MS, Ma Y, Grant CR, Samyn M, Gordon P, Mieli-Vergani G, et al. T-regs in autoimmune hepatitis-systemic lupus erythematosus/mixed connective tissue disease overlap syndrome are functionally defective and display a Th1 cytokine profile. *J Autoimmun.* 2013;41:146-51.
53. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol.* 2006;176(7):4484-91.
54. Strassburg CP, Manns MP. Treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2009;29(3):273-85.
55. Yeoman AD, Longhi MS, Heneghan MA. Review article: The modern management of autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31(8):771-87.
56. Czaja AJ. Treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis.* 2002;22(4):365-78.

-
57. Gleeson D, Heneghan MA. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut*. 2011;60(12):1611-29.
 58. Cook GC, Mulligan R, Sherlock S. Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis. *Q J Med*. 1971;40(158):159-85.
 59. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR et al. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology*. 1972;63(5):820-33.
 60. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet*. 1973;301(7806):735-7.
 61. Schvarcz R, Glaumann H, Weiland O. Survival and histological resolution of fibrosis in patients with autoimmune chronic active hepatitis. *J Hepatol*. 1993;18(1):15-23.
 62. Czaja AJ. Review article: Permanent drug withdrawal is desirable and achievable for autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(10):1043-58.
 63. Czaja AJ. Review article: The prevention and reversal of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(4):385-406.
 64. Czaja AJ, Wolf AM, Baggenstoss AH. Laboratory assessment of severe chronic active liver disease during and after corticosteroid therapy: correlation of serum transaminase and gamma globulin levels with histologic features. *Gastroenterology*. 1981;80(4):687-92.

-
65. Hartl J, Ehlken H, Weiler-Normann C, Sebode M, Kreuels B, Pannicke N, et al. Patient selection based on treatment duration and liver biochemistry increases success rates after treatment withdrawal in autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2015;62(3):642-6.
 66. Van Gerven NMF, Verwer BJ, Witte BI, Van Hoek B, Coenraad MJ, Van Erpecum KJ, et al. Relapse is almost universal after withdrawal of immunosuppressive medication in patients with autoimmune hepatitis in remission. *J Hepatol*. 2013;58(1):141-7.
 67. Montano-loza AJ, Carpenter HA, Czaja AJ. Consequences of treatment withdrawal in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int*. 2007;27(4):507-15.
 68. Czaja AJ, Menon KVN, Carpenter HA. Sustained remission after corticosteroid therapy for type 1 autoimmune hepatitis: a retrospective analysis. *Hepatology*. 2002;35(4):890-7.
 69. Kirstein MM, Metzler F, Geiger E, Heinrich E, Hallensleben M, Manns MP, et al. Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2015;62(5):1524-35.
 70. Takahashi A, Ohira H, Abe K, Miyake Y, Abe M, Yamamoto K, et al. Rapid corticosteroid tapering: Important risk factor for type 1 autoimmune hepatitis relapse in Japan. *Hepatol Res*. 2015;45(6):638-44.
 71. Yokokawa J, Kanno Y, Saito H, Abe K, Takahashi A, Yokokawa H, et al. Risk factors associated with relapse of type 1 autoimmune hepatitis in Japan. *Hepatol Res*. 2011;41(7):641-6.

72. Czaja AJ, Carpenter HA. Histological features associated with relapse after corticosteroid withdrawal in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int.* 2003;23(2):116-23.
73. Czaja AJ, Davis GL, Ludwig J, Taswell HF. Complete resolution of inflammatory activity following corticosteroid treatment of HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1984;4(4):622-7.
74. Johnson PJ, McFarlane IG, Williams R. Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. *N Engl J Med.* 1995;333(15):958-63.
75. DePinho RA, Goldberg CS, Lefkowitz JH. Azathioprine and the liver. Evidence favoring idiosyncratic, mixed cholestatic-hepatocellular injury in humans. *Gastroenterology.* 1984;86(1):162-5.
76. Guillaume P, Grandjean E, Malè PJ. Azathioprine-associated acute pancreatitis in the course of chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci.* 1984;29(1):78-9.
77. Floyd A, Pedersen L, Nielsen G, Thorlacius-Ussing O, Sorensen H. Risk of acute pancreatitis in users of azathioprine: a population-based case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(6):1305-8.
78. Eland IA, Van Puijenbroek EP, Sturkenboom MJCM, Wilson JHP, Stricker BHC. Drug-associated acute pancreatitis: Twenty-one years of spontaneous reporting in the Netherlands. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(9):2417-22.
79. Czaja AJ. Safety issues in the management of autoimmune hepatitis. *Expert Opin Drug Saf.* 2008;7(3):319-33.

-
80. Maddocks JL, Lennard L, Amess J, Amos R, Meyrick Thomas R. Azathioprine and severe bone marrow depression. *Lancet*. 1986;1(8473):156.
 81. Smith MA, Irving PM, Marinaki AM, Sanderson JD. Review article: Malignancy on thiopurine treatment with special reference to inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(2):119-30.
 82. Czaja AJ, Carpenter HA. Thiopurine methyltransferase deficiency and azathioprine intolerance in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci*. 2006;51(5):968-75.
 83. Czaja AJ. Special clinical challenges in autoimmune hepatitis: The elderly, males, pregnancy, mild disease, fulminant onset, and nonwhite patients. *Semin Liver Dis*. 2009;29(3):315-30.
 84. Terrabuio DRB. 20 anos de hepatite autoimune no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.
 85. Wang KK, Czaja AJ, Beaver SJ, Go VL. Extrahepatic malignancy following long-term immunosuppressive therapy of severe hepatitis B surface antigen-negative chronic active hepatitis. *Hepatology*. 1989;10(1):39-43.
 86. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*. 2015;23(5):231-69.

-
87. Dixon JS, Furst DE, editor. Second-line agents in the treatment of rheumatic diseases. New York: Marcel Dekker; 1992. 648 p.
 88. Rodriguez-Caruncho C, Bielsa Marsol I. Antimalarials in dermatology: mechanism of action, indications, and side effects. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105(3):243–52.
 89. Tsakonas E, Joseph L, Esdaile JM, Choquette D, Senécal JL, Cividino A, et al. A long-term study of hydroxychloroquine withdrawal on exacerbations in systemic lupus erythematosus. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group. *Lupus*. 1998;7(2):80-5.
 90. Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):20-8.
 91. Bykerk V, Sampalis J, Esdaile JM, Choquette D, Senécal J-L, Danoff D, et al. A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324(3):150-4.
 92. Meinao IM, Sato EI, Andrade LEC, Ferraz MB, Atra E. Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1996;5(3):237-41.
 93. Ugarte-Gil MF, Wojdyla D, Pastor-Asurza CA, Gamboa-Cárdenas R V, Acevedo-Vásquez EM, Catoggio LJ, et al. Predictive factors of flares in systemic lupus erythematosus patients: data from a multiethnic Latin American cohort. *Lupus*. 2017;961203317728810.

-
94. Borba EF, Latorre LC, Brenol JCT, Kayser C, da Silva NA, Zimmermann AF, et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol*. 2008;48(4):196-207.
 95. Klumb EM, Silva CAA, Lanna CCD, Sato EI, Borba EF, Brenol JCT, et al. [Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis, management and treatment of lupus nephritis]. *Rev Bras Reumatol*. 2015;55(1):1–21.
 96. Moreland LW, Russell AS, Paulus HE. Management of rheumatoid arthritis: The historical context. *J Rheumatol*. 2001;28(6):1431-52.
 97. Feely MG, O'Dell JR. Update on the use of conventional disease-modifying antirheumatic drugs in the management of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(3):316-20.
 98. Avina-Zubieta J, Galindo-Rodriguez G, Newman S, Suarez-Almazor M, Russell AS. Long term effectiveness of antimalarial drugs in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(10):582-7.
 99. Sanders M. A review of controlled clinical trials examining the effects of antimalarial compounds and gold compounds on radiographic progression in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000;27(2):523-9.
 100. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, et al. DrugBank 3.0: A comprehensive resource for “Omics” research on drugs. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D1035-41.
 101. Fox RI. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin Arthritis Rheum*. 1993;23(2 Suppl 1):82-91.

102. Scherbel AL, Schuchter SL, Harrisob JW. Comparison of effects of two antimalarial agents, hydroxychloroquine sulfate and chloroquine phosphate, in patients with rheumatoid arthritis. *Cleve Clin Q.* 1957;24(2):98-104.
103. Ducharme J, Farinotti R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. Focus on recent advancements. *Clin Pharmacokinet.* 1996;31(4):257-74.
104. Krishna S, White NJ. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 1996;30(4):263-99.
105. Tett SE, McLachlan AJ, Cutler DJ, Day RO. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxychloroquine enantiomers in patients with rheumatoid arthritis receiving multiple doses of racemate. *Chirality.* 1994;6(4):355-9.
106. Furst DE. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus.* 1996;5 Suppl 1:S11-5.
107. Wallace DJ. Antimalarials - The "real" advance in lupus. *Lupus.* 2001;10(6):385-7.
108. Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hyun S, Klinenberg JR, Stecher V. The effect of hydroxychloroquine therapy on serum levels of immunoregulatory molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994;21(2):375-6.
109. Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology.* 2006;45(6):703-10.

110. Wozniacka A, Lesiak A, Narbutt J, McCauliffe DP, Sysa-Jedrzejowska A. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2006;15(5):268-75.
111. Wallace DJ, Gudsoorkar VS, Weisman MH, Venuturupalli SR. New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(9):522-33.
112. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):823-35.
113. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010;32(3):305-15.
114. Silva JC, Mariz HA, Rocha LF Jr, Oliveira PS, Dantas AT, Duarte AL, Pitta Ida R, Galdino SL, Pitta MG. Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(6):766-71.
115. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:345803.
116. Munster T, Gibbs JP, Shen D, Baethge BA, Botstein GR, Caldwell J, et al. Hydroxychloroquine concentration-response relationships in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(6):1460-9.
117. Abdel Galil SM. Hydroxychloroquine-induced toxic hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus: a case report. *Lupus*. 2015;24(6):638-40.
118. Chowdhary VR, Crowson CS, Poterucha JJ, Moder KG. Liver involvement in systemic lupus erythematosus: case review of 40 patients. *J Rheumatol*. 2008;35(11):2159-64.

119. Matsumoto T, Kobayashi S, Shimizu H, Nakajima M, Watanabe S, Kitami N, et al. The liver in collagen diseases: Pathologic study of 160 cases with particular reference to hepatic arteritis, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis and nodular regenerative hyperplasia of the liver. *Liver*. 2000;20(5):366-73.
120. Mekinian A, Lazzaroni MG, Kuzenko A, Alijotas-Reig J, Ruffatti A, Levy P, et al. The efficacy of hydroxychloroquine for obstetrical outcome in anti-phospholipid syndrome: Data from a European multicenter retrospective study. *Autoimmun Rev*. 2015;14(6):498-502.
121. Bahloul E, Jallouli M, Garbaa S, Marzouk S, Masmoudi A, Turki H, et al. Hydroxychloroquine-induced hyperpigmentation in systemic diseases: Prevalence, clinical features and risk factors: A cross-sectional study of 41 cases. *Lupus*. 2017;26(12):1304-8.
122. Jallouli M, Francès C, Piette J-C, Huong DLT, Moguelet P, Factor C, et al. Hydroxychloroquine-induced pigmentation in patients with systemic lupus erythematosus a case-control study. *JAMA Dermatol*. 2013;149(8):935-40.
123. Jimenez-Alonso J, Tercedor J, Jaimez L, Garcia-Lora E. Antimalarial drug-induced aquagenic-type pruritus in patients with lupus. *Arthritis Rheum*. 1998;41(4):744-5.
124. Wolfe F, Marmor MF. Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(6):775-84.
125. Marmor MF, Kellner U, Lai TYY, Melles RB, Mieler WF; American Academy of Ophthalmology. Recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology*. 2016;123(6):1386-94.

-
126. da Silva NA, da Silva FA. Maculopatia tóxica por cloroquina. *Rev Bras Oftalmol.* 2009;68(3):161-7.
 127. Basnuevo J, Rodriguez-Inigo J, Sanz C, De La Cruz M. A new case of amebic abscess of liver treated with chloroquine & emetine. *Rev Kuba Med Trop Parasitol.* 1958;14(7-12):53-5.
 128. Terranova S, Gucciardi G. Chloroquine therapy of diffuse emetine-resistant amebic colliquative hepatitis. *Riforma Med.* 1958;72(31):861-5.
 129. Bhattacharya R. Chloroquine in amoebic hepatitis; with a report of 14 cases. *J Indian Med Assoc.* 1954;23(6):259-64.
 130. Pareja-Coronel A. Treatment of viral hepatitis with chloroquine. *Am J Gastroenterol.* 1963;39:288-98.
 131. Battaler Sifré R, Ortolano Gómez A, Tebar Massó J, Berto Navarro R. Favorable effect of chloroquine on chronic refractory subaggressive hepatitis. *Rev Esp Enferm Apar Dig.* 1975;45(2):123-8.
 132. Kouroumalis EA, Koskinas J. Treatment of chronic active hepatitis B (CAH B) with chloroquine: A preliminary report. *Ann Acad Med Singapore.* 1986;15(2):149-52.
 133. Helbling B, Reichen J. [Reactivation of hepatitis B following withdrawal of chloroquine]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1994;124(18):759-62.
 134. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. Lysosomotropic agents as HCV entry inhibitors. *Virol J.* 2011;8:163.

-
135. Peymani P, Ghavami S, Yeganeh B, Tabrizi R, Sabour S, Geramizadeh B, et al. Effect of chloroquine on some clinical and biochemical parameters in non-response chronic hepatitis C virus infection patients: Pilot clinical trial. *Acta Biomed.* 2016;87(1):46-53.
136. Mucenic M, Mello ES, Cançado EL. Chloroquine for the maintenance of remission of autoimmune hepatitis: Results of a pilot study. *Arq Gastroenterol.* 2005;42(4):249-55.
137. Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973;60(8):646-9.
138. National Institute of Cancer. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 4.0. NIH Publ. 2010;2009:0-71.
139. Gayotto LCC, Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. Projeto do Clube de Patologia Hepática da Sociedade Brasileira de Patologia aprovado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia. *GED Gastroenterol Endosc Dig.* 2000;19:137-40.
140. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
141. Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 1981;30(2):239-45.
142. Anderson TW, Darling DA. Asymptotic theory of certain “goodness of fit” criteria based on stochastic processes. *Ann Math Stat.* 1952;23(2):193-212.

143. Levene H. Robust tests for equality of variances. In: Olkin I et al., eds. *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Palo Alto:Stanford University Press; 1960. p.278-92.
144. Adamolekun B. Seizures associated with chloroquine therapy. *Cent Afr J Med*. 1992;38(8):350-2.
145. Tristano A, Falcón L, Wilson M, de Oca I. Seizure associated with chloroquine therapy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2004;24(5):315-6.
146. Montano-Loza AJ, Carpenter HA, Czaja AJ. Improving the end point of corticosteroid therapy in type 1 autoimmune hepatitis to reduce the frequency of relapse. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(5):1005-12.
147. Kanzler S, Gerken G, Löhr H, Galle PR, Meyer zum Büschenfelde KH, Lohse AW. Duration of immunosuppressive therapy in autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2001;34(2):354-5.
148. Verma S, Gunuwan B, Mendler M, Govindrajan S, Redeker A. Factors predicting relapse and poor outcome in type I autoimmune hepatitis: Role of cirrhosis development, patterns of transaminases during remission, and plasma cell activity in the liver biopsy. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(8):1510-6.
149. Czaja AJ, Ammon H V, Summerskill WH. Clinical features and prognosis of severe chronic active liver disease (CALD) after corticosteroid-induced remission. *Gastroenterology*. 1980;78(3):518-23.
150. Lüth S, Herkel J, Kanzler S, Frenzel C, Galle PR, Dienes HP, et al. Serologic markers compared with liver biopsy for monitoring disease activity in autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42(8):926-30.

151. Gregorio G V., Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: A 20-year experience. *Hepatology*. 1997;25(3):541-7.
152. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune liver diseases in children – What is different from adulthood? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(6):783-95.
153. Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer Zum Büschenfelde KH, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet*. 2000;355(9214):1510-5.
154. Stellon AJ, Keating JJ, Johnson PJ, McFarlane IG, Williams R. Maintenance of remission in autoimmune chronic active hepatitis with azathioprine after corticosteroid withdrawal. *Hepatology*. 1988;8(4):781-4.
155. Lamers MM, van Oijen MG, Pronk M, Drenth JP. Treatment options for autoimmune hepatitis: a systematic review of randomized controlled trials. *J Hepatol*. 2010;53:191-8.
156. Bouma G, van Nieuwkerk CM. Treatment withdrawal in autoimmune hepatitis. *Dig Dis*. 2015;33(Suppl 2):88-93.
157. Arinaga-Hino T, Ide T, Miyajima I, Ogata K, Kuwahara R, Amano K, et al. Risk of malignancies in autoimmune hepatitis type 1 patients with a long-term follow-up in Japan. *Hepatol Res*. 2018;48(3):E222-31.
158. Ngu JH, Gearry RB, Frampton CM, Stedman CA. Mortality and the risk of malignancy in autoimmune liver diseases: a population-based study in Canterbury, New Zealand. *Hepatology*. 2012;55(2):522-9.

-
159. Werner M, Almer S, Prytz H, Lindgren S, Wallerstedt S, Björnsson E, et al. Hepatic and extrahepatic malignancies in autoimmune hepatitis. A long-term follow-up in 473 Swedish patients. *J Hepatol*. 2009;50(2):388-93.
 160. Eyraud V, Chazouilleres O, Ballot E, Corpechot C, Poupon R, Johanet C. Significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas: A large French study. *Liver Int*. 2009;29(6):857-64.
 161. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int*. 2012;32(1):85-92.
 162. Al-Khalidi JA, Czaja AJ. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(12):1237-52.
 163. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology*. 1992;103(3):1041-7.
 164. Muratori P, Lalanne C, Fabbri A, Cassani F, Lenzi M, Muratori L. Type 1 and type 2 autoimmune hepatitis in adults share the same clinical phenotype. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(12):1281-7.
 165. Czaja AJ, Bayraktar Y. Non-classical phenotypes of autoimmune hepatitis and advances in diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2009;15(19):2314-28.
 166. Czaja AJ, Carpenter HA, Moore SB. Clinical and HLA phenotypes of type 1 autoimmune hepatitis in North American patients outside DR3 and DR4. *Liver Int*. 2006;26(5):552-8.

167. Amichai B, Gat A, Grunwald MH. Cutaneous hyperpigmentation during therapy with hydroxychloroquine. *J Clin Rheumatol*. 2007;13(2):113.
168. Stein M, Bell MJ, Ang LC. Hydroxychloroquine neuromyotoxicity. *J Rheumatol*. 2000;27(12):2927-31.
169. Mittal L, Zhang L, Feng R, Werth VP. Antimalarial drug toxicities in patients with cutaneous lupus and dermatomyositis: A retrospective cohort study. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(1):100-6.e1.
170. Tsang AC, Ahmadi Pirshahid S, Virgili G, Gottlieb CC, Hamilton J, Coupland SG. Hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy: A systematic review evaluating the multifocal electroretinogram as a screening test. *Ophthalmology*. 2015;122(6):1239-51.e4.
171. Costedoat-Chalumeau N, Dunogu B, Leroux G, Morel N, Jallouli M, Le Guern V, et al. A critical review of the effects of hydroxychloroquine and chloroquine on the eye. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015;49(3):317-26.