

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 DEFINIÇÃO

Esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é uma condição metabólica caracterizada por acúmulo de lípidos nos hepatócitos, infiltrado inflamatório e fibrose, com aspecto morfológico indiferenciável da doença hepática alcoólica, em indivíduos não etilistas (LUDWIG et al., 1980).

O conceito de 'esteatose hepática não alcoólica' compreende um amplo espectro de lesões, que variam de esteatose focal leve a formas com necrose, em um processo que pode levar a cirrose. A EHNA corresponde à gama que cursa com sinais histológicos de agressão inflamatória e deposição de colágeno (MATTEONI et al., 1999).

Diversos termos, como hepatite pseudoalcoólica (DESCHAMPS et al., 1994), hepatite similar à alcoólica (DIEHL et al., 1988), hepatite com esteatose (ADLER; SCHAFFNER, 1979), esteatonecrose (VAN THIEL, 1986) e hepatite diabética (NAGORE; SCHEUER, 1988), foram utilizados em alusão a essa mesma hepatopatia. Contudo, EHNA é o que se afirmou pela maior aceitação no decorrer do tempo.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Apesar de freqüente, a real prevalência de EHNA na população geral não está estabelecida. Cada vez mais, torna-se comum aos clínicos atender a pacientes assintomáticos com enzimas hepáticas elevadas, detectadas em exames de triagem. Nos Estados Unidos, pesquisas em ambulatórios de

hepatologia apresentam EHNA como o terceiro diagnóstico mais freqüente, superada apenas por hepatopatia alcoólica e hepatite crônica pelo vírus C (BYRON; MINUK, 1996). Dentre aqueles submetidos à biópsia hepática, estima-se que ocorra entre 1,2% a 9% dos casos (SHETH et al., 1997).

Em nosso meio, 10 dos 40 (25%) candidatos a doador de sangue da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo com elevação crônica da alanina aminotransferase sérica, submetidos a biópsia hepática, receberam o diagnóstico de EHNA (TOREZAN FILHO, 1999).

O número de casos de EHNA pode ser ainda maior se considerarmos a possibilidade de muitos casos de cirrose criptogênica terem sido originados em uma esteato-hepatite, conforme sugerido por CALDWELL et al. (1999).

No banco de dados 'Medline' da Biblioteca Nacional de Medicina norte-americana, 13 citações entre os anos 1980 a 1990, e 14 entre 1991 a 1995 fazem alusão ao termo 'esteato-hepatite não alcoólica' ('nonalcoholic steatohepatitis'). No período de 1996 até 1999, 48 citações, 22 das quais apenas no último ano, denotam crescente interesse e reconhecimento da importância desta entidade.

### **1.3 DIAGNÓSTICO**

A biópsia é fundamental ao diagnóstico de EHNA, segundo parecer unânime entre os especialistas reunidos em 1998, no Simpósio de Consenso

do Instituto National de Saúde dos EUA (Consensus Symposium – US National Institutes of Health). Os exames de imagem disponíveis não são capazes de detectar fibrose ou inflamação hepática com fidedignidade, e há diferença entre os prognósticos da esteatose simples à da EHNA avançada (JAMES; DAY, 1999). VAN NESS e DIEHL (1989) demonstraram um valor preditivo para o diagnóstico de EHNA sem biópsia hepática de apenas 56%.

O aspecto morfológico da EHNA é indiferenciável da esteato-hepatite alcoólica: esteatose, infiltrado inflamatório e fibrose. Cistos lipídicos, corpúsculos de Mallory, células claras, vacuolização nuclear, focos de necrose, metaplasia ductal e hemossiderina hepatocelular também podem estar presentes. A esteatose predominante é macrovesicular, com células inflamatórias polimorfonucleares em região perivenular e discreto infiltrado linfomononuclear portal. A fibrose apresenta gradiente de quantidade de colágeno maior junto à vênula hepática terminal, reduzindo-se em direção ao espaço-porta (LEE, 1998).

A literatura a respeito de padronização da avaliação histopatológica da esteato-hepatite é escassa. BRUNT et al. (1999) categorizaram dez variáveis histológicas, semiquantificadas em graus leve, moderado ou intenso, determinando atividade necroinflamatória e alterações arquiteturais.

## 1.4 HISTÓRICO

Os primeiros relatos de EHNA datam de quatro décadas atrás, quando LEEVY (1962) estudou a associação entre esteatose hepática, com ou sem necrose, em não alcoolistas, obesos ou diabéticos. Padrões histopatológicos similares também foram descritos na lipodistrofia (KLAR et al, 1970, POWELL et al, 1989), abetalipoproteinemia (PARTIN et al., 1974), perda de peso acelerada por jejum em obesos (DRENICK et al., 1970) e doença de Weber-Christian (KIMURA et al, 1980). Em 1980, FALCHUK et al. estabeleceram o diabetes mellitus não insulino-dependente como etiologia desta mesma hepatopatia, descrevendo as etapas, de esteatose com hialino de Mallory à cirrose.

Cirurgias de 'bypass' jejunoileal (HOCKING et al. 1983) e gastroplastia (HAMILTON, et al., 1983) realizadas para tratamento da obesidade mórbida, perda de peso acelerada por jejum em obesos (DRENICK et al., 1970), uso de nutrição parenteral recente (WANLESS; LENTZ, 1990), derivação biliopancreática (GRIMM et al., 1992), ressecção extensa de intestino delgado (PEURA et al., 1980), diverticulose jejunal com supercrescimento bacteriano (NAZIM et al, 1989) também foram descritas em associação com essa hepatopatia. Drogas como maleato de perexilena (PESSAYRE, et al., 1979; DESCHAMPS et al., 1994), glicocorticóides (ITOH et al., 1977), hormônios estrógenos sintéticos (SEKI et al., 1983), tamoxifeno (PRATT et al., 1995), amiodarona (LEWIS et al., 1989), e, mais recentemente, substâncias químicas por via inalatória (REDLICH; CULLEN,

1997), como a que estão expostos profissionais da indústria petroquímica (COTRIM et al., 1999) também foram imputados na gênese da EHNA.

Entretanto, por longo tempo houve resistência pelos médicos em reconhecer as etiologias propostas, e muitos pacientes foram taxados de alcoolistas não confessos.

O termo 'esteato-hepatite não alcoólica' foi utilizado pela primeira vez quando LUDWIG et al., em 1980, definiram-na como entidade clínico-histológica. Sua série, constituída de vinte indivíduos sem antecedentes de consumo alcoólico significativo, era predominantemente feminina, obesa e, com elevada frequência, diabética; o padrão histopatológico era similar à da hepatopatia alcoólica, inclusive com hialino de Mallory.

Autores como ITOH et al. (1982), DIEHL et al. (1988), LEE (1989), POWELL et al. (1990) e PINTO et al. (1996) sucederam-se, reafirmando, através de suas casuísticas, a EHNA como uma afecção benigna, de mínima progressão, do sexo feminino na sua quinta ou sexta década de vida, associada a obesidade, diabetes melito e hiperlipidemia.

Contudo, em 1994, BACON et al. publicaram sua série, na qual sexo masculino, não obesos, não diabéticos, e elevados níveis séricos de saturação de transferrina e ferritina eram características predominantes. Esse estudo provocou impacto na literatura por expandir o espectro de indivíduos acometidos, destacar o potencial cirrotizante e, principalmente, por levantar a hipótese do papel do ferro na patogenia da EHNA (LONARDO et al., 1995; PROPST et al., 1995; LEE, 1995; JAMES; DAY, 1999).

## 1.5 FISIOPATOLOGIA

O processo de formação da EHNA ocorre em duas etapas fundamentais: a deposição lipídica e a reação necroinflamatória (DAY; JAMES, 1998b).

Inicialmente, os triglicérides acumulam-se nos hepatócitos por uma ou várias das seguintes vias: aumento do aporte de ácidos graxos livres ao fígado, aumento da síntese de ácidos graxos no fígado, diminuição da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos livres ou diminuição de síntese ou de secreção da lipoproteína de baixíssima densidade (VLDL) (SHETH et al., 1997). A VLDL é a principal responsável pela secreção de ácidos graxos pelo fígado.

A seguir, um outro evento induz necrose, inflamação e fibrose. Evidências experimentais e clínicas apontam para três vias fundamentais: o estresse oxidativo, a produção anômala de citocinas e o distúrbio do metabolismo de ácidos graxos e resistência à insulina (DAY; JAMES, 1998a).

Os ácidos graxos livres no fígado são normalmente metabolizados pela  $\beta$ -oxidação mitocondrial, todavia, sob condições de estresse oxidativo, a  $\beta$ -oxidação peroxissomal é ativada, gerando peróxidos de hidrogênio. Estes, por sua vez, originam radicais hidroxil altamente reativos, que induzem a inflamação e fibrose hepática (NEUSCHWANDER-TETRI; ROLL, 1990). O acúmulo de ácidos graxos livres (ACOSTA; WENZEL, 1974), as drogas inibidoras da cadeia respiratória (BERSON et al., 1998) ou a sobrecarga de ferro (YOUNG; AISEN, 1994) são causas de estresse oxidativo.

Entretanto, o motivo pelo qual muitos pacientes com esteatose hepática, expostos aos mesmos fatores de estresse oxidativo, jamais desenvolvem esteato-hepatite é uma questão ainda por esclarecer (DAY; JAMES, 1998a).

### **1.5.1 O Ferro como Fator de Estresse Oxidativo**

O ferro catalisa a produção de radicais livres, reage com agentes redutores e oxigênio, formando os superóxidos aniônicos  $O_2^-$ , altamente lesivos. Além disso, os complexos nucleotídeos do ferro são potentes iniciadores da peroxidação lipídica, que, por sua vez, também libera radicais livres. No fígado, sob condições de excesso de ferro, esse processo é particularmente deletério, por lesar membranas de organelas celulares, estimulando a fibrogênese e determinando cirrose (YOUNG; AISEN, 1994).

Para uma melhor explanação sobre os trabalhos elaborados a partir da tese da sobrecarga de ferro (BACON et al, 1994), faz-se necessário discorrer sobre a hemocromatose hereditária (HH) e o gene *HFE*.

### **1.5.2 Hemocromatose hereditária e o Gene *HFE***

A HH é um distúrbio autossômico recessivo, no qual o aumento na absorção intestinal do ferro provoca deposição progressiva do metal principalmente nas células parenquimatosas do fígado, coração e pâncreas. A síndrome diabetes mellitus, cirrose e aumento na pigmentação da pele,



descrita inicialmente em 1865 por TROUSSEAU apud BACON (1999), foi posteriormente denominada hemocromatose por VON RECKLINGHAUSEN (1889) apud BACON (1999), que identificou o ferro como agente etiológico. O caráter genético deste erro inato do metabolismo foi observado em 1935 por SHELDON apud BACON (1999), mas somente em 1996, o grupo 'Mercator Genetics' conseguiu identificar o gene da HH (FEDER et al., 1996).

Denominado *HFE*, esse gene localiza-se no braço curto do cromossomo 6 em íntima ligação com o *locus* do *HLA* classe I. A proteína HFE, composta de 343 aminoácidos, compõe-se de uma única membrana protéica que emite três alças extra-celulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ), uma região transmembrana celular e uma cauda citoplasmática curta (FEDER et al., 1996). Essa proteína, em associação com a  $\beta 2$ -microglobulina, reduz a afinidade do receptor de transferrina (TfR), determinando o padrão de absorção intestinal do ferro (FEDER et al., 1998).

A substituição da base guanina (G) pela adenina (A) no nucleotídeo 845, resulta na substituição da cisteína (Cys) por tirosina (Tyr), no aminoácido de posição 282, denominada C282Y. Altera a associação com a  $\beta 2$ -microglobulina e a expressão do HFE na superfície da célula, impedindo a interação com o TfR, o que resulta em maior absorção de ferro (FEDER et al., 1997). Essa mutação está associada a mais de 80% das HH. Em populações nórdicas ou celtas, chega a ser responsável pela totalidade dos casos (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997).

Outra mutação, da base citosina (C) em lugar de guanina (G) no nucleotídeo de posição 187, resulta na substituição de histidina (His) por ácido aspártico (Asp) no aminoácido de posição 63 e é denominada H63D. Também reduz a afinidade do TfR por transferrina e está associada a uma forma mais leve de hemocromatose (BEUTLER, 1997).

Na Europa, a frequência alélica da mutação C282Y corresponde de 10 a 20% da população do noroeste, e de 2 a 4% no sul e leste europeu. Entretanto, é muito rara em nativos da África, América Central, América do Sul, Leste da Ásia, e Ilhas Pacíficas. A mutação H63D tem uma distribuição semelhante, porém ocorre com maior frequência, chegando a até 40% de frequência alélica em algumas populações europeias (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997).

A C282Y é associada a formas mais graves HH. Na Itália, onde se observa um gradiente de frequência da mutação, maior ao norte e reduzindo-se ao sul, os pacientes com hemocromatose que não apresentam a mutação C282Y tendem a ter uma doença de manifestação mais tardia e menos grave (PIPERNO et al., 1998).

Os heterozigotos para as mutações C282Y ou H63D podem ter acúmulo de ferro em graus intermediários, só vindo a manifestar doença na presença de um fator de sobrecarga adicional, como  $\beta$ -talassemia, hemólise crônica, alcoolismo ou hepatite C (SHAM et al., 1997). Os heterozigotos compostos C282Y/H63D, são responsáveis por cerca de 2 a 5% das HH, com quadro mais leve que o C282Y homozigoto. Esse genotipo também ocorre na população saudável (BARTON et al., 1997).

### 1.5.2 EHNA e Sobrecarga de Ferro

Dessa forma, indivíduos com mutações na proteína HFE podem cursar com sobrecarga de ferro no organismo, sem manifestar HH na forma clássica. Na presença de esteatose, o ferro atuaria como fator de estresse oxidativo, gerando inflamação e fibrose, determinando EHNA (DAY; JAMES, 1998b).

Baseados nessa hipótese, GEORGE et al. (1998) estudaram 51 pacientes australianos caucasianos com EHNA, traçando o perfil sérico de ferro, saturação da transferrina e ferritina, e a morfologia hepática à microscopia ótica. Foram determinados o índice de concentração de ferro no tecido hepático conservado em parafina e as mutações do gene *HFE*. Trinta e um por cento dos pacientes com EHNA eram homozigotos ou heterozigotos para a mutação C282Y, uma frequência três vezes superior à da população geral. Essa mutação estava significativamente associada a grau de siderose à coloração de Perls, aos índices de saturação da transferrina. Além disso, o grau de siderose histopatológica e a concentração de ferro hepático eram proporcionais ao grau de fibrose hepática. Seus resultados apontaram a mutação C282Y como responsável pela sobrecarga de ferro hepático e pelo grau de agressividade histopatológica da EHNA.

Posteriormente, BONKOVSKY et al. (1999) também demonstraram uma maior prevalência de mutações C282Y e H63D, entre norte-americanos caucasianos com EHNA, na forma homozigota ou de heterozigotos compostos, que na população geral. Nesse estudo, níveis séricos de alanino-aminotransferase, ferritina, ferro e saturação da transferrina

correlacionavam-se significativamente com o grau de deposição de ferro no tecido hepático e a presença das mutações do gene *HFE*.

Na esteatose-hepática não alcoólica, YOUNOSSI et al. (1999) não encontraram correlação similar. Foram estudados 65 pacientes norte-americanos caucasianos com esteatose hepática não alcoólica, onde foram incluídos casos de EHNA. O ferro depositado em tecido hepático foi pesquisado por coloração de azul da Prússia de Perls e foram calculados também a concentração de ferro hepático (HIC) e o índice de ferro hepático (HII). Nesse estudo, não se identificou sobrecarga de ferro tecidual significativa, tampouco associação desta com agressividade histopatológica.

## **1.6 OBJETIVOS**

- 1.6.1 conhecer o perfil clínico, laboratorial e histopatológico hepático da população com EHNA do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP);
- 1.6.2 pesquisar, nessa população, a presença das mutações C282Y e H63D do gene *HFE*;
- 1.6.3 identificar associações entre parâmetros clínico-laboratoriais, padrões histopatológicos hepáticos e mutações do gene *HFE* pesquisados.

## 2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

## **2.1 CASUÍSTICA**

### **2.1.1 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos os pacientes com diagnóstico de EHNA matriculados nos ambulatórios de Gastroenterologia do HC-FMUSP, no período de julho de 1997 a dezembro de 1999.

O diagnóstico de esteato-hepatite foi definido como presença de esteatose hepática e infiltrado inflamatório, num aspecto morfológico indiferenciável da doença hepática alcoólica (LUDWIG et al., 1980), em indivíduos não alcoolistas. Admitiram-se antecedentes de consumo alcoólico até 20 g diários.

### **2.1.3 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos todos os indivíduos com antecedentes de ingestão alcoólica em quantidade e frequência mal caracterizadas, ou consumo de etanol maior que ou igual a 20 g ao dia, por período superior a 3 meses consecutivos.

Foram excluídos também aqueles com sorologia positiva para os antígenos de superfície (HBsAg) do vírus da hepatite B, pela técnica de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA); com sorologia positiva para o vírus da hepatite C, pela técnica de ELISA 2; ou com presença de genoma do vírus da hepatite C detectada pela técnica de reação da

polimerase em cadeia (PCR), segundo resultados de exames realizados na rotina do Laboratório Central do HC-FMUSP.

Além destes, excluíram-se os pacientes com outras hepatopatias cujos quadros clínico e anátomo-patológico pudessem ser confundidos com EHNA, tais como hemocromatose, hepatite auto-imune tratada ou doença de Wilson.

### **2.1.3 Seleção da Casuística**

A casuística foi selecionada a partir de 112 pacientes com diagnóstico definido ou suspeito de EHNA, matriculados nos ambulatórios de Gastroenterologia.

Cada paciente foi informado a respeito da pesquisa, enfatizando-se a importância da veracidade das informações fornecidas, em especial quanto ao consumo alcoólico, assegurando-se-lhe continuidade do atendimento médico, independentemente de preencher ou não critérios de inclusão ao estudo. Procedeu-se, então, ao questionamento a respeito do etilismo, e, sempre que possível, reconfirmou-se a informação com um familiar. Os marcadores biológicos do alcoolismo, a saber, elevação dos valores de volume corpuscular médio eritrocitário, aspartato amino-transferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT), além de relação aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (AST/ ALT) maior que dois, foram utilizados apenas como ferramentas auxiliares no interrogatório a

respeito de ingestão de etanol (CABALLERÍA, 1995), mas não como critério diagnóstico de alcoolismo. Nessa etapa, 23 indivíduos foram excluídos por não terem informado o real consumo de álcool inicialmente, ou por não preencherem os critérios definidos em relação ao alcoolismo. Admitiu-se uma paciente que relatou consumo regular de etanol, porque a dose máxima foi de 10 g diários, tão somente nos 10 meses que antecederam à biópsia.

Os pacientes hiperlipidêmicos, diabéticos e obesos foram estimulados a realizar tratamento adequado. Aqueles em uso de drogas reconhecidamente hepatotóxicas foram orientados a suspender seu uso sempre que possível. As enzimas hepáticas foram monitorizadas ao longo de seis meses, pelo menos duas vezes, e a biópsia hepática foi indicada apenas quando houve persistência das alterações bioquímicas. Vinte e quatro pacientes tiveram a indicação de biópsia suprimida pela normalização dos parâmetros bioquímicos, após correção daquelas condições, não tendo sido, portanto, incluídos na casuística.

Nove pacientes não aceitaram submeter-se à biópsia hepática. Dos 56 pacientes remanescentes biopsiados, 19 enquadraram-se dentro do conceito de 'esteatose hepática não alcoólica' mas sem configurar EHNA, dois apresentaram cirrose hepática sem marcadores etiológicos, três fígado reacional e apenas 32 preencheram os critérios de EHNA.

Os 32 pacientes objetos deste estudo haviam sido submetido aos testes de dosagem de enzimas hepáticas, que os levou ao diagnóstico de EHNA, por motivos diversos: três (9%) para exames periódicos preventivos; quatro (12%) por doação de sangue; 13 (41%) por acompanhamento de



doenças não gastroenterológicas e 14 (35%) por investigação de síndromes gastroenterológicas.

## **2.2 MÉTODOS**

Este protocolo, em concordância com as normas éticas da convenção de Helsinki, foi aprovado pelas comissões de ética do Departamento de Gastroenterologia e da Diretoria Clínica do HC-FMUSP.

Todo o processo de seleção, anamnese e atendimento dos pacientes incluídos no estudo foram realizados pelo mesmo clínico gastroenterologista (o autor).

Cada paciente foi informado a respeito do protocolo e forneceu autorização para coleta de sangue em documento escrito (Anexo 1).

### **2.2.1 Caracterização do Perfil Clínico**

Os dados clínicos do momento da biópsia hepática diagnóstica foram obtidos por anamnese e revisão de prontuário. No caso do paciente JFA, com duas biópsias hepáticas incluídas no estudo, utilizaram-se as informações da época do primeiro diagnóstico.

Foram caracterizados os aspectos de anamnese e exames complementares especificados a seguir.

### **2.2.1.1 Sexo**

### **2.2.1.2 Idade (em anos)**

### **2.2.1.3 Etnia**

As etnias branca, negra, asiática e mestiços foram definidas com base em cor da pele em áreas sem exposição solar, conformação facial e tipo de cabelo.

### **2.2.1.4 Quadro clínico relacionado a EHNA**

Os dados clínicos foram obtidos a partir das queixas espontâneas do paciente, além da anamnese dirigida ao aparelho digestivo. O quadro clínico foi considerado relacionado a EHNA após exclusão de outras etiologias prováveis para o achado. Definiu-se por síndrome dispéptica sintomas de epigastralgia ou desconforto pós-prandial. A hepatomegalia foi medida em centímetros de fígado abaixo do rebordo costal direito, em linha hemiclavicular.

### **2.2.1.5 Condições metabólicas**

Os pacientes foram avaliados quanto a obesidade, hiperlipidemia e diabetes mellitus, segundo especificações abaixo.

2.2.1.5.1 Obesidade: índice de massa corpórea (IMC) maior que ou igual a  $30 \text{ kg/m}^2$  (KUCZMARSKI et al., 1997). O IMC corresponde ao peso corpóreo em kg, dividido pelo quadrado da altura, em  $\text{m}^2$ .

2.2.1.5.2 Hiperlipidemia: colesterolemia de maior que 200 mg/dL ou trigliceridemia maior que 200 mg/dL, com jejum de 12 horas e na ausência de hipolipemiantes (MANNINEN et al., 1988).

2.2.1.5.3 Diabetes mellitus: glicemia de jejum maior que ou igual a 126 mg/dL, ou glicemia aleatória maior que 200 mg/dL, ou curva de tolerância à glicose com glicemia maior que 200 mg/dL, na ausência de hipoglicemiantes (REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 1997).

#### **2.2.1.6 Drogas**

2.2.1.6.1 Uso de alguma das seguintes drogas, por período superior a três meses: corticosteróides, amiodarona, anticoncepcionais orais de alta dosagem e tamoxifeno.

2.2.1.6.2 Contato ocupacional com substâncias potencialmente hepatotóxicas tais como agrotóxicos, derivados petroquímicos e resíduos industriais.

2.2.1.6.3 Outras drogas utilizadas por mais que três meses consecutivos.

#### **2.2.1.7 Nutrição parenteral total**

Antecedentes de uso de nutrição parenteral total por período superior a 14 dias, nos 12 meses que antecederam à biópsia hepática.

### **2.2.1.8 Cirurgias**

Antecedentes de 'bypass' jejunoileal ou gastroplastia para tratamento de obesidade e enterectomia extensa.

### **2.2.1.9 Antecedentes Pessoais**

Levantaram-se antecedentes mórbidos pessoais adicionais, questionando-se especificamente a respeito de transfusão sangüínea e droga adição no período anterior ao diagnóstico da hepatopatia.

### **2.2.1.10 Antecedentes Familiares**

Os pacientes foram interrogados a respeito de antecedentes mórbidos hepáticos em familiares de primeiro, segundo e terceiro grau.

## **2.2.2 Caracterização do Perfil Laboratorial**

Foram obtidos os parâmetros laboratoriais do sangue de veia periférica colhido em jejum de pelo menos oito horas, dentro do período de 30 dias antes ou após a biópsia hepática. Os exames foram realizados pela rotina do Laboratório Central do HC-FMUSP. A unidade e os valores de referência dos parâmetros laboratoriais a seguir estão na Tabela 1.

### **2.2.2.1 Enzimas Hepáticas**

Foram

pesquisadas as quatro enzimas hepáticas:

2.2.2.1.1 Aspartato aminotransferase (AST);

2.2.2.1.2 Alanina aminotransferase (ALT);

2.2.2.1.3 Fosfatase alcalina (FA);

2.2.2.1.4 Gama-glutamilttransferase (GGT).

Determinou-se, para cada uma das enzimas, a relação valor dosado dividido pelo valor limite normal segundo o padrão do laboratório, denominando-a número de vezes de aumento em relação ao máximo valor normal (xVN). Realizaram-se análises comparativas entre esses resultados, a fim de se estabelecer a expressividade de cada enzima hepática na EHNA. Para fins de análise estatística, os níveis de ALT foram considerados normais para xVN menor ou igual a 1 e elevados para ALT xVN maior que 1. Calculou-se, também, para cada paciente, sua relação AST/ALT, definida pelo valor de AST xVN dividido pelo de ALT xVN.

### **2.2.2.2 Bilirrubinas**

2.2.2.2.1 Bilirrubina direta

2.2.2.2.2 Bilirrubina indireta

### **2.2.2.3 Provas de Função Hepática**

Utilizaram-se os seguintes parâmetros:

2.2.2.3.1 Albumina

2.2.2.3.2 Tempo de protrombina

A função hepática foi considerada reduzida quando os valores de albumina e de tempo de protrombina eram inferiores às suas faixas de normalidade.

#### **2.2.2.4 Perfil de Ferro**

##### 2.2.2.4.1 Saturação da transferrina

##### 2.2.2.4.2 Ferritina

A sobrecarga de ferro sérico foi definida na presença de pelo menos uma das seguintes condições:

- índices de ferritina maiores que 150 µg/L para mulheres ou maiores que 300 µg/L para homens;
- níveis de saturação de ferro maior que 40%.

#### **2.2.2.5 Eritrócitos**

##### 2.2.2.5.1 Hemoglobina

##### 2.2.2.5.2 Hematócrito

**TABELA 1 - EXAMES LABORATORIAIS E VALORES DE REFERÊNCIA**

<b>EXAMES</b>	<b>VALORES DE REFERÊNCIA</b>	<b>UNIDADES</b>
AST	≤ 1	xVN
ALT	≤ 1	xVN
FA	≤ 1	xVN
GGT	≤ 1	xVN
Bilirrubina Direta	0,1 a 0,4	mg/dL
Bilirrubina Indireta	0,1 a 0,6	mg/dL
Albumina	3,5 a 5,0	g/dL
Tempo de Protrombina	70 a 100	%
Saturação de Transferrina	20 a 40	%
Ferritina	Mulher: 10 a 150 Homem: 25 a 300	µg/dL
Hemoglobina	Mulher: 12 a 16 Homem: 14 a 18	g/dL
Hematócrito	Mulher: 35 a 45 Homem: 42 a 52	mL de eritrócitos / dL

---

xVN= número de vezes o valor normal.

### **2.2.3 Caracterização do Perfil Histopatológico Hepático**

Todos os produtos de biópsia hepática foram conservados em solução de formol, emblocados em parafina e corados com hematoxilina e eosina, azul da Prússia (coloração de Perls), tricrômio de Masson e reticulina, segundo a rotina do Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Dois observadores, o clínico que atendeu aos pacientes (o autor) e um hepatologista experiente (L.C.C.G.) procederam à avaliação do material, sem identificação dos dados clínico-laboratoriais correspondentes.

#### **2.2.3.1 Discriminação das Variáveis Histopatológicas**

As variáveis histopatológicas foram descritas e subdivididas em alterações hepatocelulares, fibrose, infiltrado inflamatório e pigmentos.

As alterações hepatocelulares procuradas sistematicamente foram: esteatose macrovesicular, esteatose microvesicular, hialino de Mallory, vacuolização nuclear, células claras, necrose focal e metaplasia ductal. Outras alterações hepatocelulares eventualmente encontradas também foram descritas.

O infiltrado inflamatório foi discriminado em linfomonocitário ou polimorfonuclear.

Quanto a pigmentos, procurou-se sistematicamente pela siderose.



### 2.2.3.2 Classificação Topográfica das Variáveis

Algumas variáveis foram classificadas topograficamente. O hialino de Mallory foi discriminado em zonas 3 ou 2-1 de Rappaport; a fibrose, em perivenular, pericelular, portal ou septal; o infiltrado inflamatório, em zonas 3 ou 1 de Rappaport; a siderose, de células de Kupffer, hepatócitos e periportal. Na presença de cirrose hepática, o hialino de Mallory, a fibrose e o infiltrado inflamatório não foram discriminados topograficamente.

As variáveis que foram classificadas e as respectivas regiões topográficas definidas estão descritas na Tabela 2.

**TABELA 2 - EHNA: CLASSIFICAÇÃO TOPOGRÁFICA DAS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS**

VARIÁVEIS	TOPOGRAFIA
Alterações Hepatocelulares	
Hialino de Mallory	Zona 3 Zonas 2-1
Fibrose	Perivenular Pericelular Portal Septal
Infiltrado Inflamatório	
Linfomonocitário	Zona 3 Zona 1
Polimorfonuclear	Zona 3 Zona 1
Pigmentos	
Siderose	Células de Kupffer Hepatocitário Interstício

NOTA: Esta classificação não foi aplicada aos casos com cirrose hepática.

### **2.2.3.3 Estadiamento**

O estadiamento foi definido sob três aspectos: alterações estruturais, atividade necroinflamatória e atividade periportal. Entende-se por alterações estruturais o reflexo do processo de deposição de colágeno, ou seja, a fibrose que lesa a arquitetura hepática normal. A atividade necroinflamatória mede a agressão e destruição hepatocelular, integrada à resposta inflamatória, excluindo-se a variável fibrose. A atividade periportal reflete o seqüestro de hepatócitos da placa limitante portal, em processo análogo à hepatite crônica.

### **2.2.3.4 Gradação das Variáveis e do Estadiamento Histopatológico**

As variáveis histopatológicas foram graduadas atribuindo-se valores de zero a quatro. Zero representou ausência da variável estudada, um a intensidade mínima, dois e três níveis intermediários e quatro a máxima intensidade conhecida em EHNA.

Para as esteatoses macro e microvesicular, a intensidade foi considerada tendo em vista a porcentagem de hepatócitos infiltrados: até 25%, grau um; entre 26 e 50%, grau dois, entre 51 e 75%, grau três e 76 a 100%, grau quatro.

No estadiamento das alterações estruturais, atribuiu-se o grau quatro para casos com septos de fibrose determinando nódulos ou quando já havia cirrose estabelecida.

Os graus foram atribuídos integrando-se densidade celular e tecidual das variáveis, considerando-se que a distribuição na amostra é

freqüentemente heterogênea. Assim, a gradação resultou tanto da freqüência com que a variável se apresentava, como também da dimensão de sua expressão.

O sistema de gradação utilizado está representado na Tabela 3.

**TABELA 3 - EHNA: GRADAÇÃO DAS VARIÁVEIS E DO ESTADIAMENTO HISTOPATOLÓGICO**

VARIÁVEL E ESTADIAMENTO	GRAUS	CRITÉRIOS DE GRADAÇÃO
Alterações Hepatocelulares		
Esteatose	0 a 4	% de hepatócitos acometidos
Hialino de Mallory	0 a 4	freqüência e dimensão
Vacuolização Nuclear	0 a 4	freqüência
Células Claras	0 a 4	freqüência
Necrose Focal	0 a 4	freqüência e dimensão
Metaplasia Ductal	0 a 4	freqüência e extensão
Outros	-	-
Fibrose	0 a 4	intensidade e extensão
Infiltrado Inflamatório		
Linfomonocitário	0 a 4	freqüência e quantidade de células
Polimorfonuclear	0 a 4	freqüência e quantidade de células
Pigmentos		
Siderose	0 a 4	intensidade e extensão
Alterações Estruturais	0 a 4	intensidade e extensão de colágeno depositado que lesa a arquitetura normal
Atividade Necroinflamatória	0 a 4	intensidade e extensão de lesão hepatocelular e de inflamação
Atividade Periportal	0 a 4	intensidade e extensão de seqüestro de hepatócitos da placa limitante portal

NOTA: **Gradação 0:** ausência da variável estudada; **1:** presença da variável em intensidade mínima; **2:** nível intermediário inferior; **3:** nível intermediário superior; **4:** presença da variável na máxima intensidade conhecida dentro desta população.

## **2.2.4 Pesquisa das Mutações do Gene *HFE***

As mutações C282Y e H63D do gene *HFE* foram detectadas pela técnica de PCR-RFLP (do inglês, “restriction fragments length polymorphism”).

### **2.2.4.1 Extração de Material Genético**

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído de sangue periférico pela técnica que utiliza brometo de hexadecil-trimetil-amônio e dodecil-trimetil-amônio (DTAB/CTAB), descrita por GUSTINCICH et al.(1991).

### **2.2.4.2 Reação de Amplificação**

As reações de amplificação do material genético foram realizadas a um volume final de 50 µl, utilizando as seguintes soluções: tampão para PCR 1 X, cloreto de magnésio a 1,5 mM, dNTPs a 0,2 mM, ‘primers’ 0,6 µM e água estéril. Para a pesquisa da mutação C282Y e da mutação H63D, utilizaram-se respectivamente Taq polimerase 1,25 U e 2,0 U; DNA 200 ng e 800 ng e pares de ‘primers’ G845A e C187G (CHRISTIAN et al., 1997).

Os materiais utilizados nesta reação e suas respectivas concentrações estão no Anexo 2 e as seqüências dos ‘primers’ estão especificadas no Anexo 3.

As soluções foram submetidas a um aparelho termociclador PTC-100™, iniciando-se o programa a 96<sup>0</sup>C, seguindo-se 34 ciclos de denaturação protéica a 96<sup>0</sup>C por 30 segundos, pareamento de bases a 56<sup>0</sup>C, por 60 segundos e extensão da fita de DNA a 72<sup>0</sup>C, por 60 segundos. A

extensão final foi realizada a 72<sup>0</sup>C por cinco minutos, encerrando-se a reação a 4<sup>0</sup>C.

Os produtos de amplificação do DNA, obtidos pelas reações com os pares de 'primers' G845A (3'5' e 5'3') e C187G (3'5' e 5'3'), foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, respectivamente, bandas de 400 e 208 pares de base (pb).

#### **2.2.4.3 Reações com Enzimas de Restrição**

O material amplificado de 400 pb foi digerido pela enzima *SnaB* I, que reconhece a substituição G por A, no codon 282 do gene *HFE*. Essa digestão fornece duas bandas - de 290 pb e 110 pb - em mutantes homozigotos. Na ausência dessa mutação, não ocorre digestão e portanto, visualiza-se apenas a banda de 400 pb. Nos mutantes heterozigotos, ocorrem as três bandas: 110 pb, 290 pb e 400 pb.

A enzima de restrição *Bcl* I foi utilizada no material amplificado de 208 pb, para reconhecimento do codon 63 na sua forma não mutante. A mutação C por G não possui sítio de restrição para esta enzima. Os indivíduos mutantes homozigotos apresentam uma única banda de 208 pb; os heterozigotos, três bandas, de 208 pb, 138 pb e 70 pb; e os não mutantes duas bandas, de 138 pb e 70 pb.

As bandas resultantes da reação com as enzimas de restrição foram separadas em gel de agarose Nusieve 4%, contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL. A corrida foi realizada em tampão Tris-EDTA-ácido acético glacial

(TEA) 1X; posteriormente, visualizou-se por transiluminação ultravioleta, fotografando-se para documentação.

A proveniência dos materiais utilizados nas reações estão no Anexo 4 e a composição das soluções no Anexo 5.

### **2.2.5 Comparações entre Parâmetros**

Para fins de análise estatística entre os diversos parâmetros clínicos, laboratoriais e histopatológicos, excluíram-se os dados da segunda biópsia hepática do paciente JFA. As comparações realizadas são discriminadas a seguir.

#### **2.2.5.1 Condições Metabólicas e Esteatose Macrovesicular**

O grupo de pacientes obesos foi comparado com o de não obesos quanto à esteatose macrovesicular. Comparações similares foram realizadas entre os pares: hiperlipidêmicos e não hiperlipidêmicos, diabéticos e não diabéticos. A esteatose macrovesicular em graus um ou dois foi considerada leve; em graus três ou quatro, intensa.

A finalidade dessa comparação era estabelecer se as condições metabólicas obesidade, hiperlipidemia e diabetes mellitus estariam associadas a esteatose hepática mais intensa.

### **2.2.5.2 Condições Associadas a EHNA e Lesões Hepáticas**

Contabilizou-se para cada paciente o número de condições associadas a EHNA, dentre as sete possibilidades: 1) sexo feminino, 2) idade maior que 40 anos, 3) obesidade, 4) hiperlipidemia, 5) diabetes mellitus, 6) antecedentes de uso dos medicamentos citados previamente, de nutrição parenteral ou de contato ambiental suspeito e 7) sobrecarga de ferro sérico.

Para fins de análise estatística, os pacientes foram divididos em dois grupos: o primeiro incluía aqueles com até três condições associadas e o segundo, aqueles com mais de três. Questionou-se, então, a associação entre quantidade de condições associadas com o estadiamento de alterações estruturais.

Essa comparação foi realizada a fim de estabelecer se o fato de haver várias condições associadas à EHNA concomitantemente em um indivíduo tornariam-no mais susceptível a uma hepatopatia mais agressiva.

### **2.2.5.3 Esteatose Macrovesicular e Outras Lesões Hepáticas**

Buscou-se estabelecer se graus maiores (três ou quatro) de esteatose macrovesicular correlacionavam-se com atividade necroinflamatória de maior intensidade (graus três ou quatro) e com alterações estruturais avançadas (graus três ou quatro).

Da mesma forma, pesquisou-se a associação entre maior deposição de fibrose perivenular (graus três e quatro) e maior atividade necroinflamatória (graus três e quatro).

#### **2.2.5.4 Elevação de ALT e Lesões Hepáticas**

A fim de estabelecer se os níveis da transaminase hepática ALT estava correlacionado com agressividade de lesão hepática, considerou-se o grupo com discreta elevação, quando ALT inferior a 3 xVN, e o grupo com intensa elevação, quando igual ou superior a 3 xVN. A lesão hepática foi avaliada quanto às alterações estruturais e à atividade necroinflamatória, consideradas leves para graus um ou dois, e intensas para graus três ou quatro.

#### **2.2.5.5 Sobrecarga de Ferro Sérico e Mutações do *HFE***

Pesquisaram-se associações entre presença de sobrecarga de ferro em sérico com a presença de pelo menos uma das mutações, C282Y ou H63D, na forma heterozigota ou homozigota.



### 3. RESULTADOS

---

### 3.1 PERFIL CLÍNICO

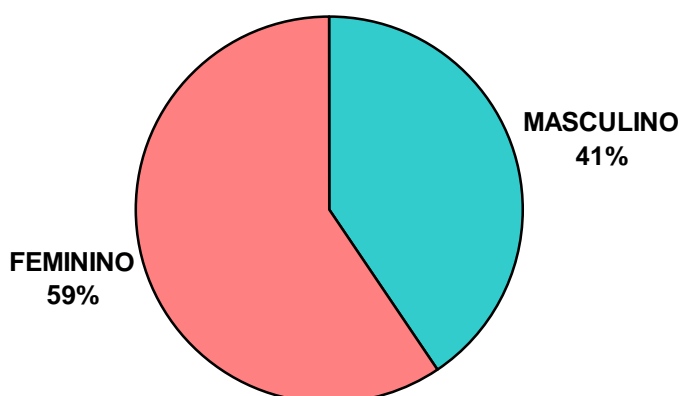
Os 32 pacientes, estudados quanto ao perfil clínico, estão representados nos Anexos 6, 7 e 8, identificados pelas iniciais dos seus nomes. Os resultados do paciente JFA referem-se à época da primeira biópsia hepática.

#### 3.1.1 Sexo

Dezenove (59%) eram do sexo feminino, e 13 (41%) do sexo masculino. A distribuição da casuística por sexo está representada no Gráfico 1.

**GRÁFICO 1 - EHNA: DISTRIBUIÇÃO POR SEXO**

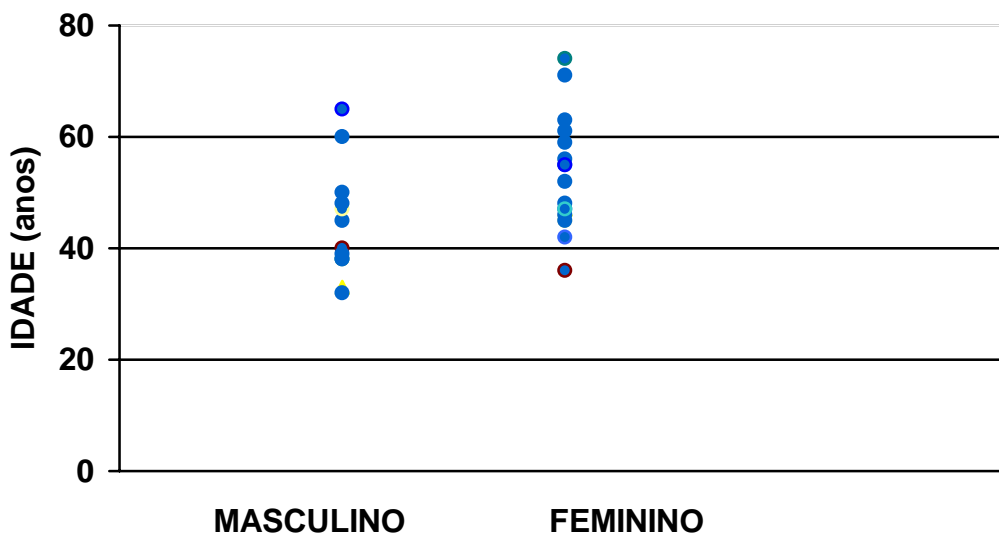
(n= 32)



### 3.1.2 Idade

A média das idades foi de 49,2 anos, sendo a idade mínima de 32 e a máxima de 74 anos. Na população masculina, as idades variaram entre 32 e 65 anos, com média de 44,2 anos; na feminina, entre 36 e 74 anos, com média 52,6. Dezenove pacientes (59%) tinham entre 41 e 60 anos. A distribuição por faixa etária e sexo está representada no Gráfico 2.

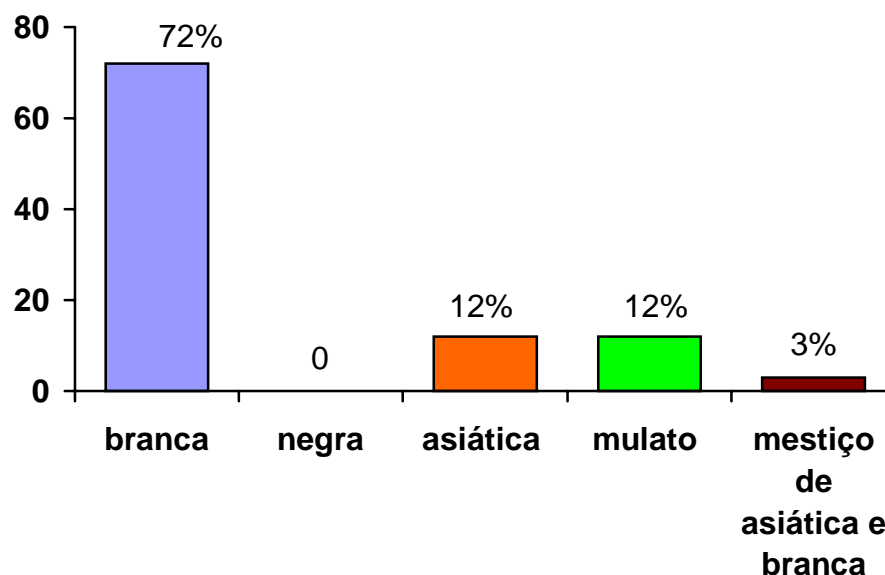
**GRÁFICO 2 - EHNA: DISTRIBUIÇÃO SEGUNDO FAIXA ETÁRIA E SEXO (n=32)**



### 3.1.3 Etnia

Foram identificados vinte e três (72%) pacientes de etnia branca, quatro (12%) de asiática, quatro (12%) mulatos e um mestiço de branca e asiática (3%). A distribuição dos pacientes por etnias está representada no Gráfico 3.

**GRÁFICO 3 - EHNA: DISTRIBUIÇÃO SEGUNDO ETNIAS  
(n= 32)**

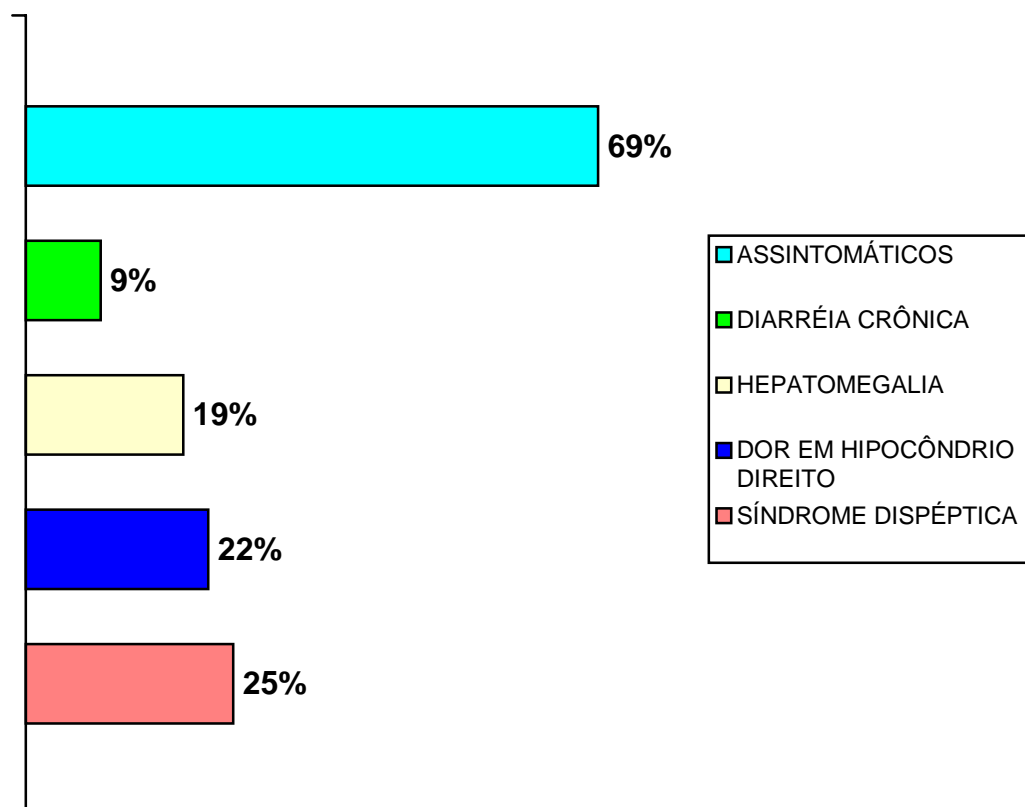


### 3.1.4 Quadro Clínico Relacionado a EHNA

Ocorreram síndrome dispéptica em 8 casos (25%), dor em hipocôndrio direito em 7 (22%), hepatomegalia em 6 (19%) e diarreia crônica em 3 (9%). Vinte e dois (69%) eram assintomáticos em relação ao aparelho

digestivo. Nenhum paciente apresentou icterícia. O Gráfico 4 expressa esses achados.

**GRÁFICO 4 - QUADRO CLÍNICO RELACIONADO À EHNA (n= 32)**



### 3.1.5 Condições Metabólicas

Em 25 pacientes (78%) ocorreu pelo menos uma das alterações metabólicas: obesidade, hiperlipidemia ou diabetes mellitus tipo II. Dezesesseis (50%) eram obesos, 17 (53%) hiperlipidêmicos e dez (31%) diabéticos.

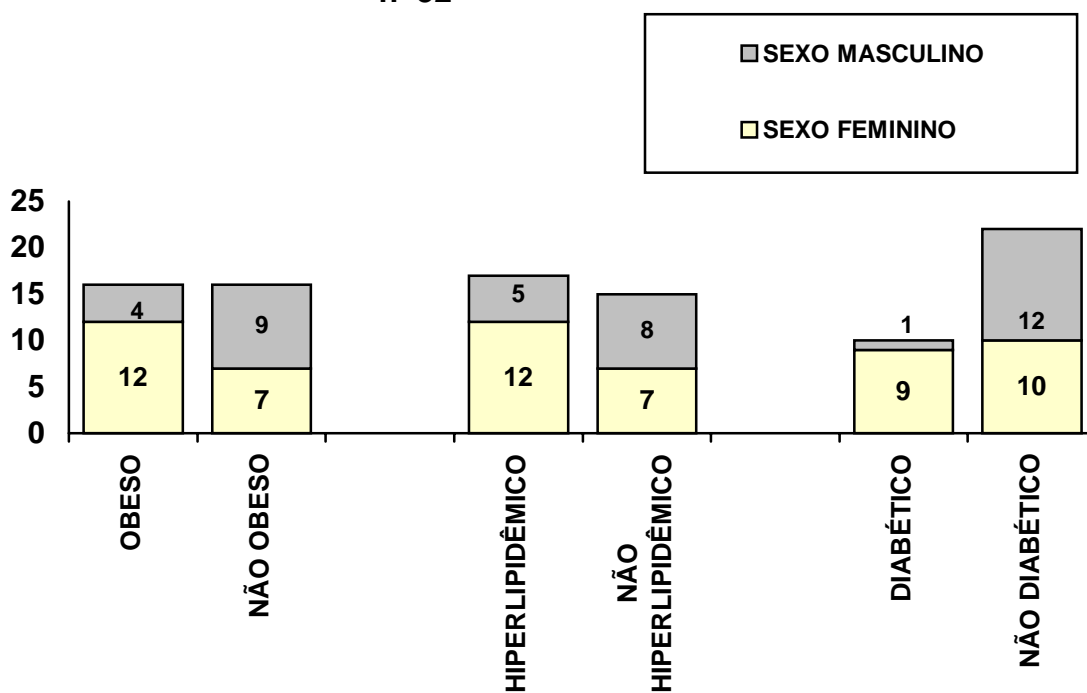
Dentre os obesos, 12 eram do sexo feminino e quatro do masculino.

Dentre os hiperlipidêmicos, 12 eram do sexo feminino e cinco do masculino.

Dentre os diabéticos, nove eram do sexo feminino e apenas um do masculino. O Gráfico 5 expressa esses achados.

**GRÁFICO 5 - EHNA E CONDIÇÕES METABÓLICAS**

n=32



### 3.1.6 Drogas

Seis pacientes (19%) referiram antecedentes de contato com as drogas relacionadas a EHNA. Três (9%) relataram ingestão oral de medicações: amiodarona em dois casos e prednisona em um. Os demais

casos referiam-se a contato ocupacional por funcionários de uma companhia siderúrgica.

Dentre os medicamentos hepatotóxicos não associados a EHNA, a alfa-metildopa ocorreu em três casos: ASS, DAA e MELP. O paciente ESS recebeu metotrexate, ciclofosfamida e doxorubicina.

Dentre os medicamentos não tidos como hepatotóxicos, as categorias mais freqüentes foram: anti-hipertensivos, hipoglicemiantes orais, insulina e hipolipemiantes.

### **3.1.7 Nutrição Parenteral**

Nenhum paciente havia recebido nutrição parenteral.

### **3.1.8 Cirurgias**

Um paciente, MN, previamente hígido e não obeso, havia sido submetido a enterectomia extensa cinco anos antes, em virtude de ferimento de arma de fogo. Evoluiu com diarréia crônica, desnutrição e enzimas hepáticas elevadas, sem receber nutrição parenteral. A biópsia hepática foi realizada seis meses após compensação da síndrome, por persistirem as alterações bioquímicas.

Nenhum paciente apresentou antecedentes de cirurgia para tratamento de obesidade.

### **3.1.9 Antecedentes Pessoais**

Nenhum paciente apresentou antecedentes pessoais de droga adição.

Somente o paciente RF relatou hemotransfusão 10 anos antes da biópsia hepática, em virtude de complicações relacionadas a uma nefrolitíase.

Onze pacientes (35%) não apresentaram nenhum outro antecedente mórbido. Dentre os portadores de uma doença crônica concomitante, predominaram hipertensão arterial sistêmica em nove casos (28%) e tireoidopatias em seis casos (19%).

### **3.1.10 Antecedentes Familiares**

Em quatro pacientes (13%) constataram-se antecedentes mórbidos hepáticos fatais em familiares de primeiro e ou de segundo grau. Nos casos ASS e JFA, os familiares eram etilistas. No caso MEF, a etiologia da cirrose não foi definida, tendo-se afastado, contudo, o etilismo. O pai de SAA teve o diagnóstico de hemocromatose hereditária, segundo relatos dos familiares.



## 3.2 PERFIL LABORATORIAL

Os resultados dos exames laboratoriais constam nos Anexos 9 e 10. Cada caso está identificado pelas iniciais do nome do paciente. Os dados relativos ao paciente identificado por JFA são inerentes à primeira biópsia hepática.

### 3.2.1 Enzimas Hepáticas

Os níveis de AST, ALT, FA e GGT foram comparados entre si utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, encontrando-se significância estatística entre os grupos, com  $p= 0,0001$ . Aplicou-se então o teste de Wilcoxon para as amostras independentes. Os seguintes pares apresentaram  $p < 0,05$ , mostrando associação estatisticamente significativa: AST e ALT; AST e FA; ALT e FA; ALT e GGT e FA e GGT.

A ALT foi a enzima com alterações mais pronunciadas, elevando-se até 4,8 xVN, com mediana de 2,1 xVN e estando normal em apenas um caso. A AST apresentou elevação de até 4,7 xVN, com mediana de 1,5 xVN e estando normal em sete casos. A GGT apresentou elevação de até 16,3 xVN, com mediana de 1,15 xVN e estando normal em sete casos. A FA estava em níveis normais em 24 casos. As Tabelas 4 e 5, e o Gráfico 6 exibem esses resultados.

Quando se calculou a relação AST/ALT de cada caso, isto é, o valor de AST (xVN) dividido pelo de ALT (xVN), todos os resultados obtidos foram inferiores a dois, sendo em 25 pacientes (78%) inferiores também a um. Os sete pacientes que apresentaram valores de AST/ALT menores que dois, porém maiores que um foram: ECP, IBS, MAS, MNB, MELP, MEF e SS.

**TABELA 4 - EHNA: VALOR DE p NA COMPARAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE ELEVAÇÃO DAS ENZIMAS HEPÁTICAS**

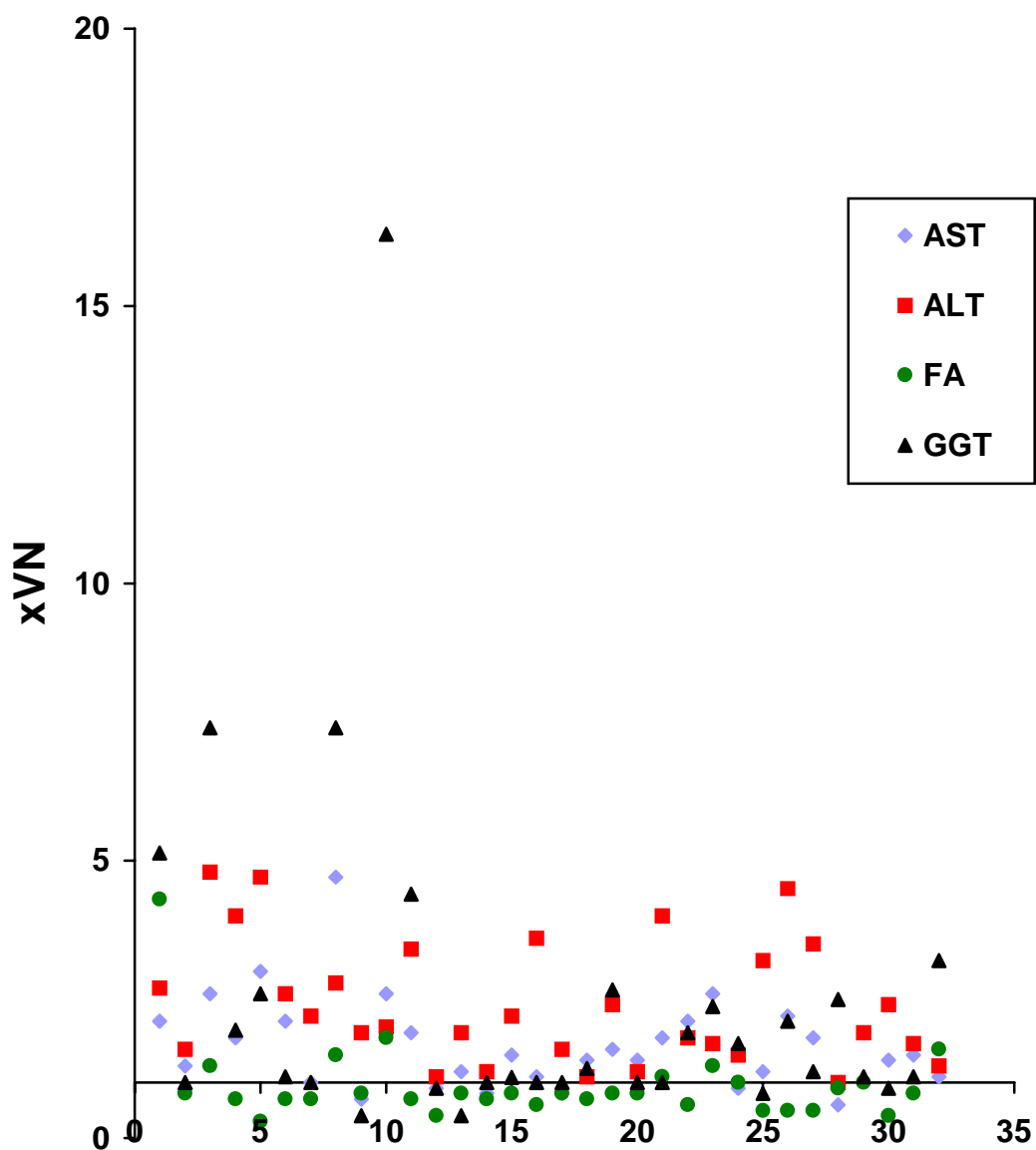
PARÂMETRO 1	PARÂMETRO 2	P
AST (xVN)	ALT (xVN)	0,004
AST (xVN)	FA (xVN)	0,0001
AST (xVN)	GGT (xVN)	0,877
ALT (xVN)	FA (xVN)	0,0001
ALT (xVN)	GGT (xVN)	0,017
FA (xVN)	GGT (xVN)	0,010

NOTA: Foi utilizado o teste de Wilcoxon para as amostras independentes. Para  $p < 0,05$  existe significância estatística.

**TABELA 5 - EHNA: VARIAÇÕES NOS NÍVEIS DAS ENZIMAS HEPÁTICAS (n=32)**

ENZIMA	MEDIANA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
AST(xVN)	1,5	0,6	4,7
ALT(xVN)	2,1	1,0	4,8
FA(xVN)	0,8	0,3	4,3
GGT(xVN)	1,2	0,4	16,3

GRÁFICO 6 - EHNA: NÍVEIS DE ENZIMAS HEPÁTICAS  
(n=32)



NOTA: xVN é o número de vezes de elevação em relação ao máximo normal. A linha de base do eixo X delimita xVN igual a 1; valores iguais ou inferiores indicam enzimas com valores dentro da normalidade.

### **3.2.2 Bilirrubinas**

Apenas um paciente apresentou nível de bilirrubina direta acima do limite definido de normalidade, com 0,5 mg/dL, sendo o limite superior da normalidade 0,4 mg/dL. Seis apresentaram níveis elevados de bilirrubinas indiretas, variando de 0,8 a 2,7 mg/dL, sendo o limite superior da normalidade definido em 0,6 mg/dL.

### **3.2.3 Provas de Função Hepática**

Os pacientes AMAS e RMO apresentaram redução do nível de albumina (2,4 e 3,1mg/dL respectivamente). Os pacientes ECP e MELP apresentaram redução do tempo de protrombina (69% e 49% respectivamente). Nenhum paciente apresentou alteração concomitante de ambas as variáveis, albumina e tempo de protrombina.

### **3.2.4 Perfil de Ferro Sérico**

Dezessete pacientes (53%) apresentaram sobrecarga de ferro sérico, sendo dez com elevação da saturação de transferrina, dez com de ferritina, sendo que em três casos as alterações ocorreram em ambos os testes.

### **3.2.5 Eritrócitos**

Todos os pacientes apresentaram índices de hemoglobina e hematócrito dentro da faixa de normalidade. Dentre os 17 pacientes com sobrecarga de ferro sérico, dez (59%) eram do sexo feminino, com médias de hemoglobina igual a 14,9 g/dL e hematócrito igual a 44,3 %. As pacientes do sexo feminino sem a sobrecarga apresentavam médias de hemoglobina igual a 14,0 g/dL e hematócrito igual a 42,2. Sete pacientes eram do sexo masculino, com médias de hemoglobina igual 16,1 g/dL e hematócrito 46,8%. Os pacientes do sexo masculino sem sobrecarga de ferro sérico apresentavam médias de hemoglobina igual a 16,1 g/dL e de hematócrito igual a 47,4.

## **3.3 PERFIL HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO**

Os resultados da avaliação histopatológica hepática, de acordo com o formulário preenchido, estão expressos no Anexo 10. Cada caso está identificado pelas iniciais dos nomes dos pacientes. A síntese dos resultados está expressa na Tabela 6.

O paciente JFA foi submetido a duas biópsias hepáticas, comprovando progressão das alterações estruturais hepáticas esteato-

hepatite, dentro do período de três anos. A primeira (Figura 1) foi realizada por alteração de enzimas hepáticas e a segunda (Figura 2), por ocasião de uma colecistectomia, ainda mantendo as alterações bioquímicas em níveis similares.

O paciente IBS também foi submetido a duas biópsias hepáticas no intervalo de dez anos, por apresentar enzimas hepáticas persistentemente alteradas. Inicialmente constatou-se esteatose sem inflamação, apenas na segunda biópsia definiu-se esteato-hepatite.

A esteatose macrovesicular ocorreu em todos os casos, sendo que em 27 (82%), foi considerada intensa. Já a esteatose microvesicular ocorreu em 24 casos (73%). Desses, 23 apresentaram-na em graus leves, sempre inferiores à quantidade de esteatose macrovesicular concomitante. Em apenas um caso, JZS, ocorreu esteatose microvesicular grau quatro, mais intensa que a esteatose macrovesicular concomitante (Figura 3).

Quanto às demais alterações hepatocelulares, células claras ocorreram em trinta casos (91%) e necrose focal também na mesma frequência (91%); hialino de Mallory e vacuolização nuclear em 28 casos (85%) cada um (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8). Com menores frequências, a metaplasia ductal foi observada em 13 casos (39%), corpúsculos de Councilman em três (9%), lipogranulomas em dois (6%) e megamitocôndria em apenas um (3%) (Figuras 9 e 10).

**FIGURA 1****NÓDULOS DELIMITADOS POR SEPTOS DE FIBROSE**

O processo envolve vênulas centro-lobulares, poupando o espaço-porta.  
(caso J.F.A., primeira biópsia hepática, coloração de Masson)

**FIGURA 2****CIRROSE HEPÁTICA**

Progressão da lesão (vide Figura 1)  
(caso J.F.A., segunda biópsia, coloração de Masson)

**FIGURA 3**

**FIGURA 4**

**A) ESTEATOSE MICROVESICULAR**  
(caso JZS coloração HE)

**B) CÉLULA CLARA**  
**C) ESTEATOSE**  
**MACROVESICULAR**  
(caso IBS, coloração HE)

**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

**D) HIALINO DE MALLORY**  
**E) INFILTRADO INFLAMATÓRIO**  
**PREDOMINANTEMENTE DE**  
**CÉLULAS**  
**POLIMORFONUCLEARES**  
(caso TA, coloração HE)

**F) NECROSE FOCAL**  
(caso TA, coloração HE)



**FIGURA 7**

**FIGURA 8**

**G) ESTEATOSE MACROVESICULAR**  
**H) CÉLULAS CLARAS**  
(Caso TA, coloração HE)

**I) VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR**  
(caso TA, coloração HE)

**FIGURA 9**

**FIGURA 10**

**J) METAPLASIA DUCTAL**  
(caso SS, coloração HE)

**K) CORPÚSCULO DE COUNCILMAN**, com fragmento do núcleo em seu interior  
(caso DAA, coloração HE)

Houve fibrose em todos os casos, com graus proporcionalmente maiores em topografia perivenular e ou pericelular (Tabela 7) (Figuras 11 e 12). Entretanto, em seis pacientes observou-se fibrose predominante em região portal ou septal.

Todos os casos apresentaram infiltrado inflamatório em zona 3 de Rappaport, representada por células polimorfonucleares ou linfomonocitárias. Por outro lado, em seis casos (18%) o infiltrado inflamatório estava ausente em zona 1. O infiltrado de células polimorfonucleares em zona 3 (Figura 13) foi o achado de maior expressividade, apresentando graus maiores que ou equivalentes aos demais padrões de inflamação em 20 casos (61%) (Tabela 8).

A siderose foi visualizada em três casos (9%), mais freqüentemente em células de Kupffer (Tabela 9) (Figura 14).

Vinte casos (61%) apresentaram alterações estruturais leves, mas treze (39%) já possuíam alterações avançadas. Destes últimos, em dois (6%) estabeleceu-se o diagnóstico anátomo-patológico de cirrose, sem quadro clínico-laboratorial de insuficiência hepática correspondente.

Dezoito casos (55%) apresentaram atividade necroinflamatória leve. Doze casos (36%) apresentaram atividade periportal, sendo leve em 11.

**FIGURA 11**

**FIGURA 12**

**L) FIBROSE PERIVENULAR**  
(caso TA, coloração de Masson)

**M) FIBROSE PERICELULAR**  
(caso IBS, coloração de Masson)

**FIGURA 13**

**FIGURA 14**

**N) INFILTRADO INFLAMATÓRIO  
EM ZONA 3 DE CÉLULAS  
POLIMORFONUCLEARES  
PREDOMINANTEMENTE**  
(caso TA, coloração HE)

**O) SIDEROSE GRAU 3 EM  
CÉLULAS DE KUPFFER**  
**P) SIDEROSE GRAU 1 EM  
HEPATÓCITOS**  
(caso SAA, coloração de Perls)

**TABELA 6 – EHNA: ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS HEPÁTICOS  
(n=33)**

<b>VARIÁVEL</b>	<b>TOTAL % (n)</b>	<b>GRAUS 1 OU 2 % (n)</b>	<b>GRAUS 3 OU 4 % (n)</b>
Esteatose Macrovesicular	100% (33)	18% (6)	82% (27)
Esteatose Microvesicular	73% (24)	70% (23)	3% (1)
Hialino de Mallory	85% (28)	46% (15)	40% (13)
Vacuolização Nuclear	85% (28)	76% (25)	9% (3)
Células Claras	91% (30)	58% (19)	33% (11)
Necrose Focal	91% (30)	82% (27)	9% (3)
Metaplasia Ductal	40% (13)	33% (11)	6% (2)
Corpúsculo de Councilman	9% (3)	-	-
Lipogranulomas	6% (2)	-	-
Megamitocôndria	3% (1)	-	-
Fibrose Perivenular <sup>(1)</sup>	100% (33)	61% (20)	40% (13)
Infiltrado Inflamatório Polimorfonuclear de Zona 3 <sup>(2)</sup>	100% (33)	70% (23)	30% (10)
Siderose	9% (3)	6% (2)	3% (1)
Alterações Estruturais	100% (33)	61% (20)	40% (13)
Atividade Necroinflamatória	100% (33)	55% (18)	46% (15)
Atividade Periportal	36% (12)	33% (11)	3% (1)

<sup>(1)</sup> para os pacientes com cirrose hepática, considerou-se o grau quatro

<sup>(2)</sup> para os pacientes com cirrose hepática, considerou-se o grau geral de infiltrado polimorfonuclear

**TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DA FIBROSE NA EHNA (n= 31)**

<b>TOPOGRAFIA</b>	<b>TOTAL % (n)</b>	<b>GRAUS 1 OU 2 % (n)</b>	<b>GRAUS 3 OU 4 % (n)</b>
Perivenular	100% (31)	65% (20)	36% (11)
Pericelular	74% (23)	52% (16)	23% (7)
Periportal	65% (20)	36% (11)	29% (9)
Septal	65% (20)	65% (20)	- (0)

NOTA: Nesta análise foram excluídos os dois pacientes com cirrose hepática.

**TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA EHNA (n= 31)**

<b>TIPO CELULAR E TOPOGRAFIA</b>	<b>TOTAL % (n)</b>	<b>GRAUS 1 OU 2 % (n)</b>	<b>GRAUS 3 OU 4 % (n)</b>
Polimorfonuclear de Zona 3	100% (31)	71% (22)	23% (9)
Polimorfonuclear de Zona 1	76% (25)	65% (20)	16% (5)
Linfomononuclear de Zona 3	76% (25)	68% (21)	13% (4)
Linfomononuclear de Zona 1	76% (25)	68% (21)	13% (4)

NOTA: Nesta análise foram excluídos os dois pacientes com cirrose hepática.

**TABELA 9 – CARACTERÍSTICAS DA SIDEROSE NA EHNA (n=33)**

<b>TOPOGRAFIA</b>	<b>TOTAL % (n)</b>	<b>GRAUS 1 OU 2 % (n)</b>	<b>GRAUS 3 OU 4 % (n)</b>
Células de Kupffer	9% (3)	6% (2)	3% (1)
Hepatócitos	9% (3)	9% (3)	-
Região Periportal	6% (2)	6% (2)	-

### 3.4 MUTAÇÕES DO GENE *HFE*

Os resultados da leitura das bandas estão no Anexo 12. Cada caso está identificado pelas iniciais do nome do paciente. Nas Figuras 15 e 16 visualizam-se as imagens obtidas na leitura das bandas de DNA obtidas após as reações com enzimas de digestão *Bcl* I e *Sna*B I, para pesquisa das mutações C282Y e H63D.

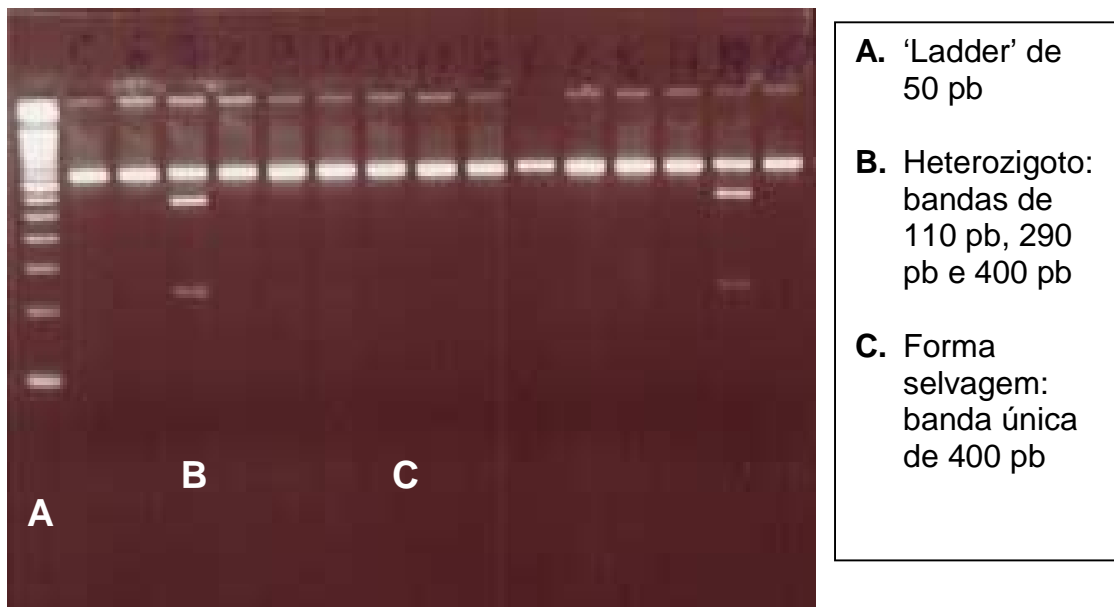
Houve um paciente com a mutação C282Y na forma heterozigota (CY). Nenhum paciente apresentou a forma mutante homozigota (YY). A mutação H63D na forma heterozigota (HD) ocorreu em oito pacientes da casuística. A forma homozigota (DD) ocorreu em um paciente.

As frequências alélicas de C282Y e H63D entre pacientes com EHNA estão na Tabela 10.

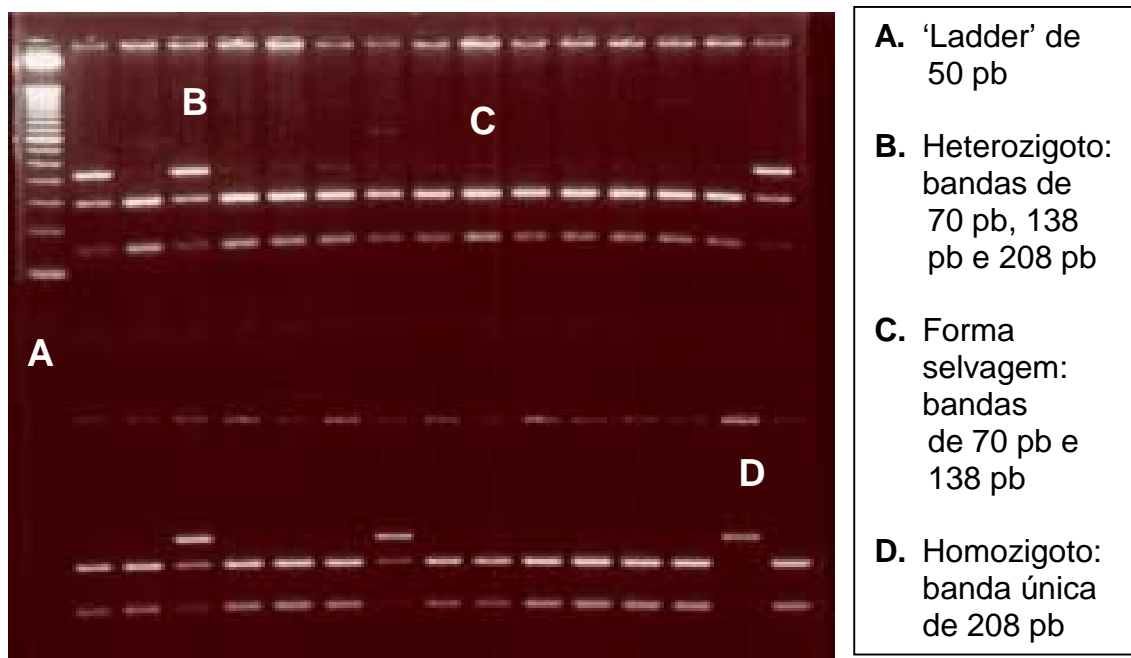
**TABELA 10 – FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES DO GENE *HFE* C282Y E H63D ENTRE PORTADORES DE EHNA (n=31)**

<b>MUTAÇÃO</b>	<b>FREQUÊNCIA ALÉLICA</b>
C282Y	0
H63D	0,1

**FIGURA 15- REAÇÃO DE DIGESTÃO: DNA AMPLIFICADO COM A ENZIMA *Sna*B I, PARA PESQUISA DA MUTAÇÃO C282Y**



**FIGURA 16 - REAÇÃO DE DIGESTÃO: DNA AMPLIFICADO COM A ENZIMA *Bcl* I, PARA PESQUISA DA MUTAÇÃO H63D**



### 3.5 COMPARAÇÕES ENTRE PARÂMETROS

As comparações efetuadas, os respectivos testes estatísticos e os valores de p encontrados estão listados na Tabela 11.

**TABELA 11 - EHNA: COMPARAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS**

<b>FATOR DETERMINANTE</b>	<b>VARIÁVEL ASSOCIADA</b>	<b>P</b>	<b>TESTE ESTATÍSTICO</b>
Obesidade	Esteatose macrovesicular	0,999	Fisher
Hiperlipidemia	Esteatose macrovesicular	0,645	Fisher
Diabetes mellitus	Esteatose macrovesicular	0,555	Qui-quadrado
Quantidade de condições associadas a EHNA	Alterações estruturais	1,0	*
Esteatose Macrovesicular	Atividade necroinflamatória	0,624	Fisher
Esteatose Macrovesicular	Alterações estruturais	0,737	Qui-quadrado
<b>Atividade Necroinflamatória</b>	<b>Fibrose perivenular</b>	<b>0,026</b>	<b>Qui-quadrado</b>
Elevação de ALT	Alterações estruturais	0,324	Qui-quadrado
Elevação de ALT	Atividade necroinflamatória	0,535	Qui-quadrado
Sobrecarga de Ferro Sérico	Mutação C282Y	0,999	Fisher
Sobrecarga de Ferro Sérico	Mutação H63D	0,157	Qui-quadrado

NOTA: Para  $p < 0,05$ , existe associação estatisticamente significativa.



### **3.5.1 CONDIÇÕES METABÓLICAS E ESTEATOSE HEPÁTICA**

A esteatose macrovesicular em graus mais intensos não apresentou associação estatisticamente significativa com a presença de obesidade, hiperlipidemia e diabetes mellitus.

### **3.5.2 CONDIÇÕES ASSOCIADAS A EHNA E LESÕES HEPÁTICAS**

O fato de haver de mais de três condições associadas a EHNA coexistentes em um indivíduo não se associou estatisticamente com alterações estruturais avançadas.

### **3.5.3 ASSOCIAÇÕES ENTRE ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS**

Os graus maiores de esteatose macrovesicular não se associaram estatisticamente com atividade necroinflamatória intensa, nem com alterações estruturais avançadas. Houve associação estatisticamente significativa entre fibrose perivenular intensa e atividade necroinflamatória também intensa, com  $p < 0,05$  (Gráfico 7).

### **3.5.4 ELEVAÇÃO DE ALT E ALTERAÇÕES HEPÁTICAS**

Os níveis de elevação da enzima ALT também não apresentaram associação estatisticamente significativa com estadiamento de alterações estruturais, tampouco com grau de atividade necroinflamatória (Gráfico 8).

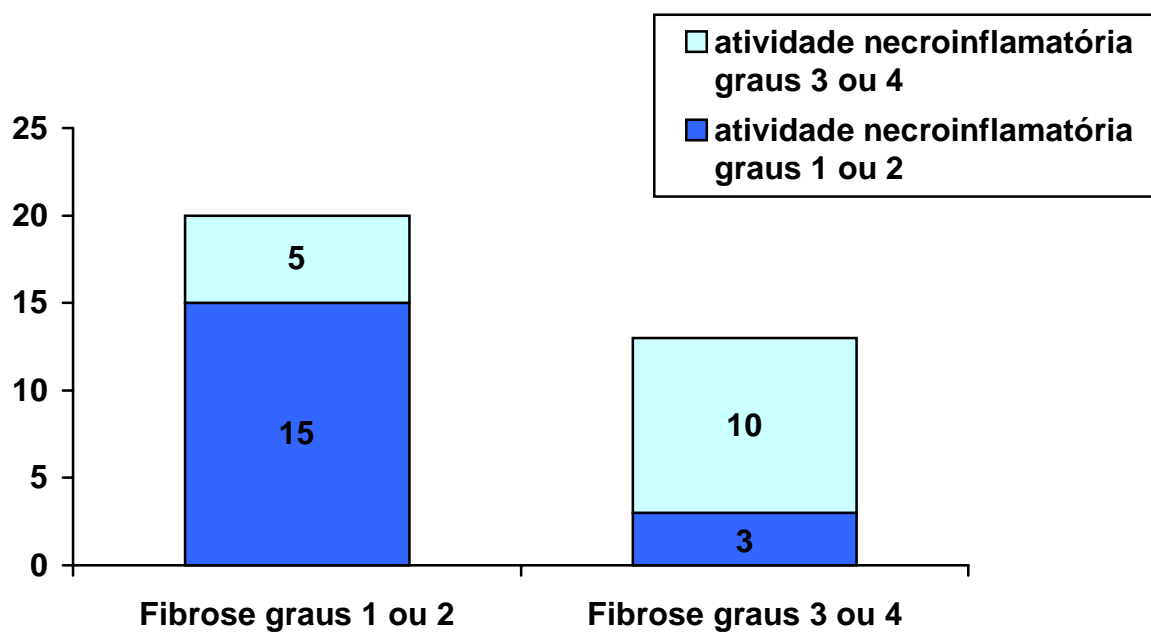
### **3.5.5 SOBRECARGA DE FERRO SÉRICO E LESÕES HEPÁTICAS**

A presença de perfil de ferro com sobrecarga sérico não refletiu em maiores graus de atividade necroinflamatória (Gráfico 9), nem em estádios mais avançados de alterações estruturais, segundo os testes estatísticos aplicados.

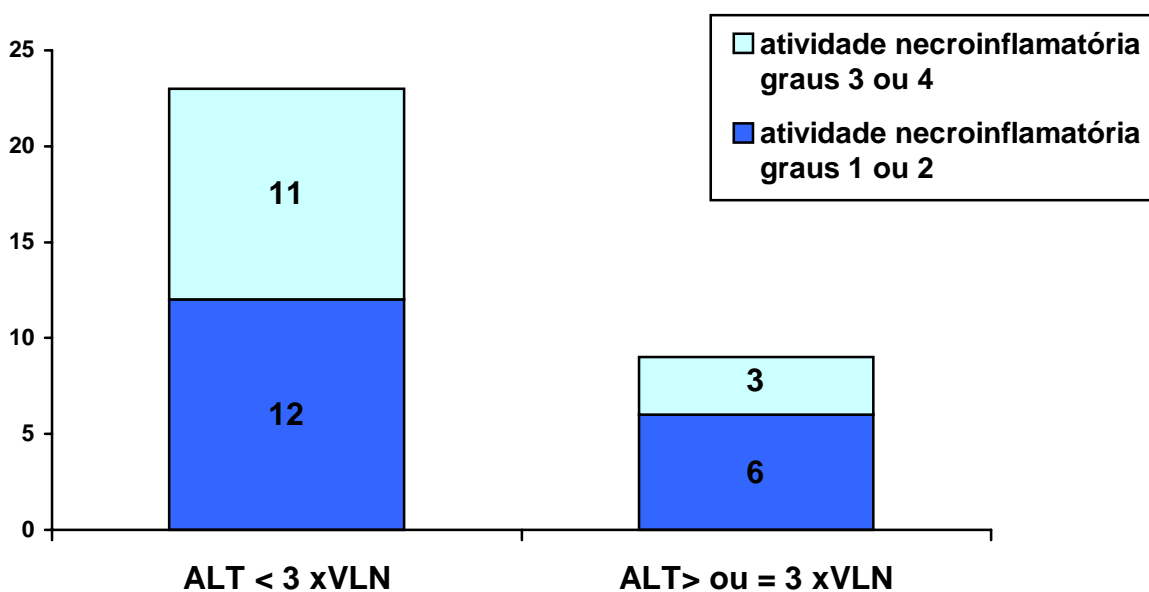
### **3.5.6 SOBRECARGA DE FERRO SÉRICO E MUTAÇÕES DO GENE *HFE***

Dentre os 16 pacientes com sobrecarga de ferro sérico e pesquisa das mutações do gene *HFE*, apenas um era heterozigoto para a mutação C282Y. Nove apresentaram a mutação H63D, dos quais apenas um era homozigoto. Apenas um paciente sem sobrecarga apresentava a mutação H63D na forma heterozigota. A presença de sobrecarga de ferro sérico não se associou estatisticamente com as mutações C282Y e H63D. Esses aspectos estão expressos no Gráfico 10.

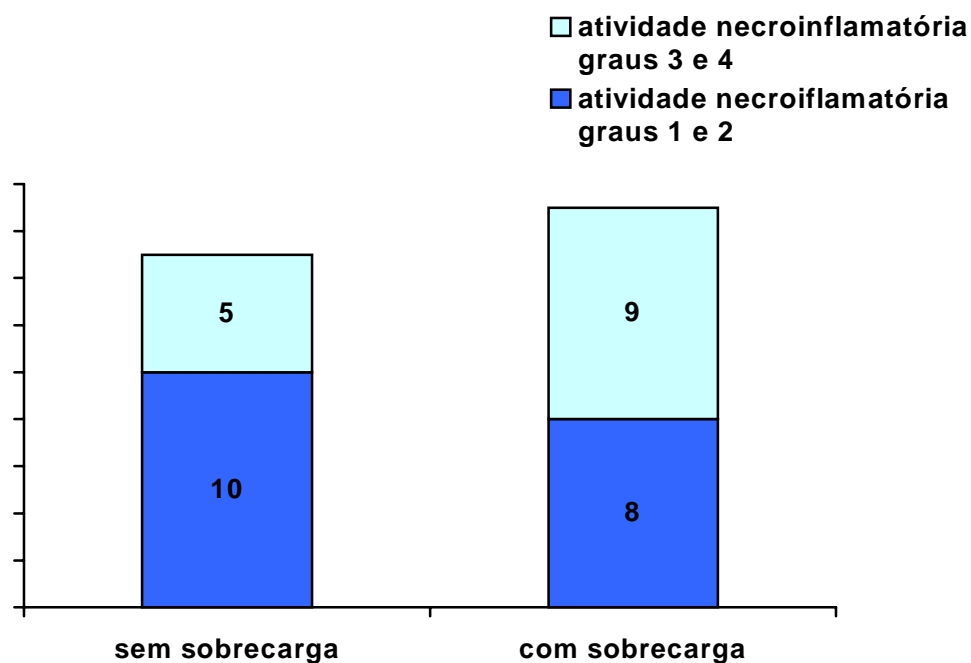
**GRÁFICO 7 - EHNA: FIBROSE PERIVENULAR E  
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA**  
n=33



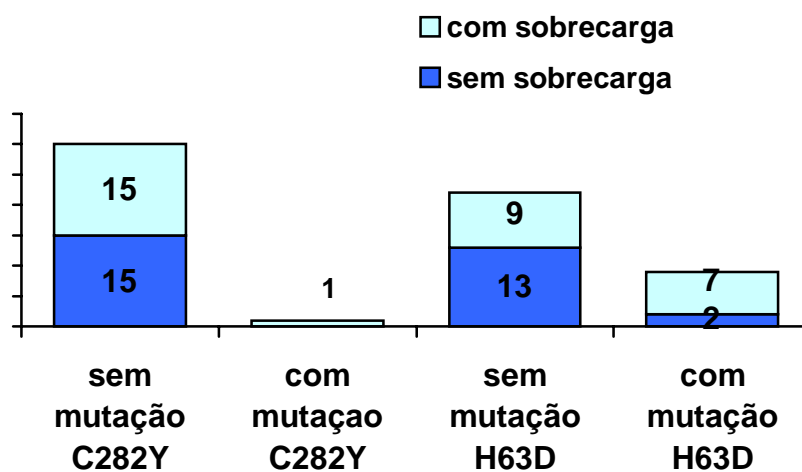
**GRÁFICO 8 - EHNA: NÍVEIS DE ELEVAÇÃO DE ALT E  
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA**  
n=33



**GRÁFICO 9 - EHNA: SOBRECARGA DE FERRO SÉRICO E ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA (n=32)**



**GRÁFICO 10 - EHNA: SOBRECARGA DE FERRO EM SANGUE PERIFÉRICO E MUTAÇÕES DO GENE *HFE* (n=31)**



## 4. DISCUSSÃO

---

O rigor nos critérios adotados para definição da EHNA restringiu a casuística aos 32 indivíduos. O critério de excluir ex-etilistas e 'etilistas sociais', aqueles bebedores que, pelo uso irregular, não sabiam informar a dose média diária ingerida, foi motivado pelo padrão de consumo alcoólico brasileiro, amplamente difundido e tido como um dos mais expressivos do mundo. O máximo consumo alcoólico diário permitido de 20 g foi definido com base no conhecimento que doses maiores já são capazes de induzir esteatose hepática (COATES et al., 1986). Dessa forma, obteve-se maior segurança no afastamento do fator álcool como etiologia da lesão hepática, limitando-se a possibilidade diagnóstica de EHNA. Outras publicações valeram-se de critérios mais permissivos, afastando o alcoolismo pela negação de consumo de bebidas em levantamentos retrospectivos (LUDWIG et al., 1980; BACON et al., 1994), utilizando limites de consumo de doses diárias de 40 g (POWELL et al., 1990) até 80 g (COTRIM et al., 1999), ou pela simples ausência de antecedentes médico-sociais suspeitos recorrentes (WANLESS; LENTZ, 1990), resultando em maior abrangência populacional.

A conduta em nossa rotina ambulatorial, de orientar todo potencial portador de EHNA a corrigir as condições associadas e monitorizar as enzimas hepáticas por seis meses também contribuiu para restringir a casuística. Quando se suspende o uso de medicações hepatotóxicas (INTERNATIONAL CONSENSUS MEETING, 1990) ou se promove o emagrecimento de pacientes com obesidade ou sobrepeso, ainda que modestamente (ERIKSSON et al., 1986; UENO et al., 1997), pode-se obter

normalização das enzimas hepáticas na EHNA. Essa conduta provavelmente suprimiu a indicação de biópsia em muitos casos, não permitindo que se estabelecesse o diagnóstico.

O critério histopatológico para definição de EHNA consistiu em esteatose com infiltrado inflamatório lobular, numa lesão indiferenciável da doença alcoólica, acarretando em exclusão de casos de esteatose simples associada a infiltrado inflamatório reacional, bem como aqueles de esteatose intensa, com células claras, hialino de Mallory e sem infiltrado inflamatório. O paciente IBS, por exemplo, apresentava esteatose simples na primeira biópsia, e somente na segunda, dez anos após, preencheu os critérios de inclusão. Portanto, apesar da EHNA ser uma entidade bem definida (LUDWIG, et al., 1980), não pode ser vista de maneira estanque. Os limites requeridos para o diagnóstico têm importância para afastar casos como galactosemia, toxicidade por metotrexate e doença de Wilson (LEE, 1995); por outro lado, denotam inconsistências que vêm reforçando o conceito mais abrangente de 'esteatose hepática não alcoólica' (MATTEONI et al., 1999).

O perfil clássico do paciente com EHNA, caracterizado como mulher obesa e de meia-idade, correspondeu a aproximadamente um terço do grupo. Os 59% de sexo feminino na casuística de EHNA do HC-FMUSP foram uma taxa inferior ao dos primeiros estudos, onde as mulheres representavam mais de 75% (DIEHL et al., 1988; POWELL et al., 1993) e aos mais recentes, com menos de 50% (BACON et al., 1994; TELI et al., 1995). Comportamento similar ocorreu em relação à frequência de

obesidade, diabetes mellitus e hiperlipidemia, com resultados intermediários aos extremos descritos.

Na Tabela 12 estão listadas as características gerais de séries de EHNA publicadas, em comparação aos dados obtidos no presente estudo.

**TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DA EHNA: SÉRIES PUBLICADAS E A CASUÍSTICA DO HC-FMUSP**

<b>AUTOR ANO</b>	<b>n</b>	<b>IDADE (média em anos)</b>	<b>SEXO FEMININO (%)</b>	<b>OBESI- DADE (%)</b>	<b>DIABETES MELLITUS (%)</b>	<b>DISLIPI- DEMIA (%)</b>
LUDWIG et al., 1980	20	54	65	90	50	67
DIEHL et al., 1988	39	52	81	71	55	20
LEE et al., 1989	49	53	78	69	51	*
POWELL et al., 1990	42	49	83	95	36	81
BACON et al., 1994	33	47	42	39	21	21
TELI et al., 1995	40	57	45	30	10	23
<b>HC-FMUSP 2000</b>	<b>32</b>	<b>49</b>	<b>59</b>	<b>50</b>	<b>31</b>	<b>53</b>



A elevada freqüência de mulheres com EHNA encontrada parece ser reflexo da maior prevalência de obesidade no sexo feminino. De fato, na sociedade urbana brasileira, 13% das mulheres e apenas 6% dos homens têm IMC maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup> (MONTEIRO, 1998). O consumo alcoólico mais freqüente entre os homens também pode ter influenciado os percentuais encontrados.

Todavia, a maior freqüência de mulheres entre obesos, diabéticos e hiperlipidêmicos observada na casuística sugere também que elas possam ser mais susceptíveis à EHNA. Experimentalmente, demonstrou-se que, expostos a estímulo tóxicos similares, ratas obesas desenvolvem esteato-hepatite com maior freqüência que seus pares machos (YANG et al., 1997). A falência hepática com esteatose microvesicular da gestação (BURT et al., 1998), a descrição de EHNA associada aos estrógenos sintéticos no tratamento de climatério ou de câncer prostático (SEKI et al., 1983; DIEHL et al., 1988), o conhecimento que os hormônios femininos interferem na estrutura e função mitocondrial (FROMENTY; PESSAYRE, 1997) também sustentam essa hipótese. Contudo, não houve nenhum caso com antecedentes de uso de hormônios femininos no grupo estudado.

O antecedente de hipertensão arterial sistêmica em 28% dos pacientes da casuística foi compatível com sua prevalência de até 48% na população geral brasileira (YUNIS; KROB, 1998). Entretanto, MARCEAU et al. (1999), relataram esteato-hepatite agressiva e cirrose na evolução da síndrome X (hipertensão arterial sistêmica, resistência periférica à insulina, dislipidemia e distribuição de gordura corporal em padrão andrógono),

tornando a hipertensão arterial sistêmica passível de ser condição associada ou fator preditivo de gravidade da EHNA.

As tireoidopatias, segundo diagnóstico mais freqüente dentre as condições ditas não associadas a EHNA, provocam distúrbios no metabolismo lipídico (TSIMIHODIMOS et al., 1999). Dentre os cinco portadores de tireoidopatias da casuística, quatro tiveram o diagnóstico de hipotireoidismo e também quatro de hiperlipidemia, de modo que a associação pode ter sido indireta.

A ausência de pacientes em sua segunda e terceira décadas de vida acompanhou a menor prevalência de obesidade nessa faixa etária em nosso meio. Esse dado contrasta com a população de adolescentes norte-americanos, que tem 13% de obesos (MONTEIRO, 1998) e apresenta EHNA como o mais freqüente diagnóstico das biópsias hepáticas realizadas entre eles (BALDRIDGE et al., 1995).

O fato de adolescentes assintomáticos normalmente não se submeterem a avaliações médicas de triagem é uma outra explicação para esses resultados. No estudo, os exames laboratoriais para doação de sangue, admissão em um emprego, acompanhamento de tratamentos de hipertensão arterial e hipotireoidismo foram os motivos de detecção de EHNA mais comuns. Além disso, os serviços de Gastroenterologia e de Hepatologia pediátricas do mesmo complexo hospitalar também assistem a pacientes na juventude, o que reduz o universo de indivíduos nessa faixa etária a procurar os ambulatórios de Gastroenterologia Clínica.

A distribuição étnica dos pacientes com EHNA, negra (ausente), mulato ou cafuso (12%), asiática (12%) e branca (72%) - não corresponde à da população geral do sudeste brasileiro, respectivamente, 7,4%, 26,5%, 0,6% e 65,4% (IBGE, 1997).

O achado de menores índices de EHNA entre negros e seus mestiços que entre brancos e asiáticos, proporcionalmente à sua representatividade na população, deve ser analisada tendo em vista a fragilidade dos extratos étnicos (FLINT et al., 1993) decorrente do rico processo de miscigenação brasileiro (YOKOMIZO, 1998). Além disso, em nosso meio não se dispõem de dados estatísticos analisando a incidência de obesidade, diabetes mellitus e hiperlipidemia por etnias. Apesar das séries publicadas até o presente momento também referirem-se a caucasianos e asiáticos, permanece a questão se a etnia negra estaria geneticamente protegida da EHNA.

Já a elevada frequência proporcional encontrada de asiáticos pode estar relacionada à deficiência da enzima aldeído-desidrogenase (ALDH), do genotipo ALDH2\*2 que ocorre em aproximadamente 50% da população japonesa e chinesa (LUMENG; CRABB, 1994). Os portadores dessa deficiência apresentam intolerância orgânica à ingestão alcoólica, e teriam preenchido com clareza os critérios de ausência de etilismo. Por este motivo, os asiáticos estariam relativamente mais sujeitos a receber o diagnóstico de EHNA que o restante da população.

A dor em hipocôndrio direito ocorreu quase sempre ligada à hepatomegalia, provavelmente decorrente da deposição de gordura. Já a

síndrome dispéptica, manifesta em um quarto da casuística, é um diagnóstico genérico e não encontra sua causa necessariamente ligada à EHNA. Não se observaram maiores graus de estadiamento nos casos mais sintomáticos.

Nenhum paciente apresentou insuficiência hepática quando avaliado no contexto clínico, laboratorial e histopatológico. Tempo de protrombina e albuminemia apresentaram-se reduzidos em quatro pacientes, mas as alterações ocorreram isoladas, isto é, nunca foram de ambas as provas concomitantemente. Dentre os dois pacientes portadores de cirrose hepática, apenas um apresentou alteração laboratorial correspondente: o caso MELP, com redução no tempo de protrombina. No caso AMAS, com alterações estruturais hepáticas em grau um, a hipoalbuminemia pode ter sido uma resposta à hipergamaglobulinemia do lúpus eritematoso sistêmico (KESHGEGIAN, 1984).

A ausência de correlação entre níveis de elevação da ALT com atividade necroinflamatória e com estágio de alterações estruturais demonstraram que a dosagem desta enzima não é eficaz na identificação de gravidade da agressão hepática. Por outro lado, a ALT, acima dos limites da normalidade em todos os casos exceto um, pareceu ser o melhor parâmetro bioquímico de triagem para a detecção de EHNA. Este achado, porém, pode ter sido apenas consequência de uma amostragem viciada, já que elevações crônicas de enzimas hepatocelulares (AST e ALT) são critérios indicativos para a biópsia hepática, enquanto as de canaliculares (FA e GGT) não necessariamente o são (SCHIFF, E.R.; SCHIFF, L., 1997).

O caso RMO ilustrou a questão, porque a identificação da EHNA partiu do achado de elevação de apenas uma enzima canalicular, com transaminases dentro dos parâmetros de normalidade. A GGT variou dentro de uma faixa maior de amplitude, entre as enzimas hepáticas estudadas, e associou-se com os níveis de ALT e FA de modo significativa. No entanto, a GGT normal em 22% dos casos não seria eficaz para a detecção de casos de EHNA. A ampla variabilidade nos níveis de elevação em resposta ao uso de diversos medicamentos, inclusive corticosteróides, e não relacionada aos graus das lesões hepáticas, demonstraram que a GGT também não se aplicaria no reconhecimento de agressividade do processo.

A relação AST/ALT, com taxa menor que dois em toda a casuística, foi similar à descrita por outros autores e compatível com o diagnóstico de EHNA. PINTO et al. (1996), comparando as esteato-hepatites de etiologia alcoólica e não alcoólica em pacientes ambulatoriais e hospitalizados, demonstraram que valores de AST/ALT maiores ou iguais a dois sugerem fortemente etiologia alcoólica, e quando menores que dois, a não alcoólica. SORBI et al. (1999) acrescentaram que taxas de AST/ALT menores que um são relativamente sensíveis e altamente específicas para EHNA; superiores a dois bastante específicas, mas pouco sensíveis para a hepatopatia alcoólica. Esses autores associam as taxas de AST/ALT entre um e dois a EHNA com fibrose mais acentuada ou cirrose. Esse comportamento não se repetiu no presente estudo, já que os sete casos com índices de AST/ALT entre um e dois apresentaram graus de alterações estruturais tanto leves como avançados.

O motivo da elevação predominante de ALT em relação à AST na EHNA permanece incompreendido. Alguns estudos atribuem a elevação mais acentuada de AST total na hepatopatia alcoólica à deficiência de piridoxina (DIEHL et al., 1986), ao estímulo da expressão e exportação de AST mitocondrial induzida pelo álcool (ZHOU et al., 1998) ou à diminuição da capacidade de clareamento pelos sinusóides hepáticos (SHETH et al., 1998); por conseguinte, na ausência do álcool, não haveria o estímulo à exacerbação de AST. A literatura a respeito ainda é escassa, e o mecanismo de elevação das transaminases com suas diferenças etiológicas ainda aguardam esclarecimentos.

Como se demonstrou, os perfis clínico e bioquímico não foram eficazes na avaliação da agressão hepática, confirmando a importância da biópsia para avaliação do estágio da EHNA. Em dois terços da casuística não houve queixas relacionadas ao aparelho digestivo, a anamnese não identificou características específicas do diagnóstico ou do estadiamento de EHNA e a magnitude das alterações das enzimas hepáticas também foram incapazes de traduzir intensidade ou gravidade da hepatopatia.

Os dois pacientes com antecedentes de mais de uma biópsia hepática manifestaram progressão da lesão estrutural com maior desarranjo da arquitetura lobular de grau três para quatro, e de grau zero para três, nos intervalos respectivos de dez e de três anos. POWELL et al. (1989) avaliaram 42 casos de EHNA, com uma ou mais biópsias, ao longo de um período superior a duas décadas de seguimento. Nesta série, dois casos tiveram diagnóstico inicial de cirrose, um terceiro desenvolveu a posteriori, e

associada a carcinoma hepatocelular. Portanto, embora o caráter oligossintomático e a evolução indolente o potencial agressivo da EHNA não deve ser subestimado.

No presente trabalho, onze variáveis discriminadas topograficamente foram semi-quantificados em quatro graus, e a seguir, integradas para a obtenção do estadiamento de alterações estruturais, atividade necroinflamatória e atividade periportal. Apesar da importância da histopatologia hepática na EHNA, ainda não existe uma padronização consensual na sua descrição morfológica, da mesma forma como o índice de atividade histológica de KNODELL et al. (1981) é amplamente aceito para avaliação das hepatites crônicas.

O hialino de Mallory foi identificado na maioria dos casos (85%). No passado considerados quase patognomônicos da doença alcoólica (BIAVA, 1964), hoje são reconhecidos também na EHNA. No presente estudo, o grau quatro foi atribuído para o padrão máximo de expressão conhecido apenas na EHNA, porque na doença alcoólica, caracteristicamente, ele atinge proporções maiores (DIEHL, et al.; 1988). Sem morfologia definida, há uma certa dificuldade na diferenciação do hialino de Mallory com os hepatócitos balonizados. A pesquisa utilizando anticorpos contra citoqueratinas ou ubiquitina talvez pudessem melhorar não apenas sua identificação, mas também a de hepatócitos contendo sinais de degeneração do citoesqueleto, isto é, formas precursoras ou incipientes de Mallory (LEE, 1998). A detecção precoce dessas lesões seria particularmente instigante nos pacientes com enzimas hepáticas elevadas e esteatose hepática simples à avaliação

rotineira. O caso IBS, sem alterações degenerativas na primeira biópsia, e evoluindo posteriormente para uma EHNA com alterações estruturais em grau quatro, constitui um exemplo da necessidade de identificar lesões histopatológicas mais precocemente.

O infiltrado de células polimorfonucleares agregadas ao redor de hepatócitos lesados foi a característica principal da inflamação da casuística, e em concordância com a literatura (LEE, 1998; SHETH, 1998; LUDWIG, 1980). Apenas FALCHUCK et al. (1980), descrevendo a hepatopatia diabética, consideraram a ausência de neutrófilos a marca que a diferenciaria da doença alcoólica. Esse achado não foi reproduzido, e a presente casuística também apontou o oposto: todos os pacientes diabéticos apresentaram infiltrado polimorfonuclear, preponderantes ou não em relação ao infiltrado linfomononuclear coexistente.

A fibrose ocorreu em todos os pacientes da casuística, assim como nas séries clássicas de EHNA. Sua presença variou entre 63% a 100% (LUDWIG et al., 1980; LEE, 1989; ITOH et al., 1987; DIEHL et al., 1988; BACON et al., 1994). A distribuição encontrada correspondeu, de maneira geral, à do infiltrado inflamatório, confirmando os achados descritos previamente: o processo patogênico origina-se na região perivenular e progride centrifugamente, até envolver a região periportal, formando septos, determinando, finalmente, cirrose. As propostas de gradação e estadiamento de LEE (1998), de BRUNT et al. (1999), bem como a utilizada no presente estudo, foram elaboradas a partir desse conceito. Nos pacientes CAC, LCMN, JZS, NB, RMO e ZMM, contudo, a deposição de colágeno ocorreu



mais intensamente em região portal ou septal. O papel da fibrose nos critérios diagnósticos da EHNA, o significado de sua presença e de seu padrão de distribuição merecem melhor esclarecimento.

A correlação estatisticamente significativa encontrada entre atividade necroinflamatória e fibrose perivenular ( $p=0,026$ ) pareceu plausível dentro das teorias fisiopatogênicas propostas (DAY; JAMES, 1998b), pois a deposição de colágeno constituiria resposta à agressão inflamatória. Curiosamente, BRUNT et al. (1999) não estabeleceram essa correlação, e consideraram que elas refletiriam aspectos da lesão hepática independentes entre si.

A gradação das alterações estruturais e da atividade necroinflamatória foram fundamentais porque expressavam, respectivamente, a deposição de fibrose e a agressividade do processo de inflamação. Já a atividade periportal revelou-se prescindível: esteve ausente em 64% dos casos e, quando presente, era em graus inferiores aos da atividade necroinflamatória, reforçando a diferença patogênica existente entre as esteato-hepatites e as hepatites crônicas.

Não se observaram correlações estatisticamente significantes entre grau de esteatose macrovesicular com a atividade necroinflamatória, nem com as alterações estruturais. Esses achados contrariam as evidências de que o grau de esteatose seria preditivo para o desenvolvimento de esteato-hepatite em alcoolistas (SORENSEN et al., 1984) e não alcoolistas (WANLESS; LENTZ, 1990), pois estaria em estreita correlação com a peroxidação lipídica (LÉTTERON, 1996).

O caso do paciente JZS fez-se destacar porque, além do padrão de fibrose predominantemente septal, apresentou grau quatro de esteatose microvesicular, maior que a macrovesicular coexistente, com atividade necroinflamatória pobre, infiltrado constituído eqüitativamente de células polimorfonucleares perivenulares e linfomononucleares periportais. A esteatose microvesicular, que ocorre relacionada a drogas inibidoras da beta-oxidação mitocondrial (FROMENTY; PESSAYRE, 1997), neste paciente pode ter sido decorrente da inalação de substâncias químicas voláteis a que estava exposto profissionalmente. Entretanto, nem o padrão de EHNA dos outros dois funcionários da mesma indústria siderúrgica, CAC e JCS, nem o descrito no pólo petroquímico baiano (COTRIM et al., 1999) assemelharam-se ao encontrado no paciente JZS. Um estudo epidemiológico abrangendo todos os profissionais dessa empresa, bem como o esclarecimento a respeito da natureza das substâncias a que estão expostos poderiam contribuir para a compreensão dessas questões. Considere-se também as evidências que sugerem que a esteatose microvesicular e macrovesicular sejam estágios contínuos de progressão da mesma lesão (DAY; YEAMAN, 1994). Dessa forma, o achado no paciente JZS seria resultado apenas de uma detecção mais precoce da hepatopatia.

No caso MN, a via da agressão hepática foi relacionada à enterectomia extensa. Essa cirurgia provoca aumento da permeabilidade no intestino remanescente, trazendo à circulação hepática lipopolissacárides bacterianos (VAZQUEZ et al., 1988). Estes geram toxicidade mediante produção de  $TNF\alpha$  (GROVE et al., 1997) ou estímulo de interferon  $\gamma$ , que

sensibiliza os hepatócitos à ação do  $TNF\alpha$  (YANG et al., 1997). No paciente MN, o uso de ácido ursodeoxicólico (LAURIN et al., 1996) e metronidazol (DRENICK et al., 1982) nos anos que antecederam a biópsia hepática, podem ter atenuado a lesão encontrada.

Os resultados encontrados foram diferentes da série de BACON et al. (1994) pelo predomínio do sexo masculino, numa faixa etária mais jovem, não obesa e não diabética, associada a maiores índices de saturação de ferro, ferritina e mutação C282Y. No presente estudo, os homens foram minoria, em média oito anos mais jovens que as mulheres. Dentre eles, apenas oito (25%) tinham peso normal e não eram diabéticos, cinco apresentavam sobrecarga de ferro sérico, três tiveram siderose à coloração de Perls e somente um portava a mutação H63D. A seguir, serão descritos alguns desses casos, destacando-se suas particularidades.

O paciente GTEF não apresentou nenhuma das condições associadas a EHNA, salvo a sobrecarga de ferro sérico. O diagnóstico de HH era compatível com a saturação da transferrina encontrada (MCLAREN, 1998; ADAMS; VALDBERG, 1996), mas não se consolidou na análise da siderose, em grau reduzido e ausente em região periportal, na negatividade das mutações e na ausência de história familiar. A esteato-hepatite, neste caso, pode ser uma forma de apresentação incipiente, de uma hemocromatose secundária ou primária com mutação ainda desconhecida (SHAM et al., 1997; PIETRANGELO, 1998). Pode, ainda, ser uma EHNA típica com diagnóstico hepático precoce, em um paciente cujas alterações

metabólicas ainda não se evidenciaram, mas nesse caso, a sobrecarga de ferro sérica e a siderose hepática permanecem inexplicadas.

O paciente SS, diabético, apresentava níveis de saturação de transferrina e ferritina séricas fortemente sugestivas de HH (MCLAREN, 1998; ADAMS; VALDBERG, 1996). A etnia asiática, entretanto, era pouco compatível com o diagnóstico, pois nessa população as mutações C282Y e H63D têm apenas 1,9% de frequência alélica (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1997). De fato, o padrão de deposição de ferro no tecido hepático, a ausência de história familiar e a ausência das mutações não confirmaram a suspeita de HH. Sendo uma EHNA típica, associada ao diabetes mellitus, a questão da etiologia da sobrecarga de ferro sérico e da siderose hepática, como no caso anterior, carecem de uma explicação.

O paciente SAA destacou-se pelo antecedente familiar de hemocromatose, mas o padrão de siderose, com deposição de ferro predominante em células de Kupffer e ausente em região periportal, o perfil de ferro sérico normal e a ausência das mutações não confirmaram HH. A natureza da EHNA nesse caso, colocadas as mesmas ressalvas dos casos anteriores, poderia ser resultado apenas da obesidade.

O depósito de ferro, portanto, nos poucos casos em que foi identificado, ocorreu em graus leves, envolvendo células de Kupffer e sem caracterizar predileção por região periportal. Na hemocromatose africana, o depósito também é panlobular, sem gradiente periportal-perivenular e envolvendo as células de Kupffer, embora a siderose seja caracteristicamente intensa (GORDEUK et al., 1992). Entretanto, a baixa

freqüência de EHNA na etnia negra e mestiços da casuística não favorece essa hipótese. Uma discreta sobrecarga de ferro sérico secundária explicaria a siderose de células de Kupffer, mas não se identificaram antecedentes mórbidos compatíveis, como hemotransfusão, eritropoiese ineficaz crônica ou hemodiálise. Novas mutações do *HFE* (MURA et al., 1999; WALLACE et al., 1999), bem como a possibilidade de haver outros genes envolvidos no intrigante metabolismo do ferro, ampliam as perspectivas para elucidar essas questões.

Optou-se por não determinar o índice de ferro hepático porque LUDWIG et al. (1993) demonstraram que esse cálculo é desnecessário quando não há siderose à coloração de Perls ou quando a siderose é predominante em células de Kupffer ou em macrófagos.

Ademais, a população com EHNA apresentou freqüências de mutações do gene *HFE* em níveis compatíveis com os da população geral. AGOSTINHO et al. (1999), em estudo realizado na Universidade de Campinas (UNICAMP) em São Paulo, determinaram as freqüências dessas mutações em diversos grupos étnicos que compõem a população brasileira. Quando se consideram as etnias branca, negra e mulatos, as freqüências alélicas de C282Y variaram entre 1,1 a 1,4%, e de H63D entre 6,4 a 20,3%. PEREIRA et al. (em publicação) também estudaram essas mutações nos doadores de sangue de etnias branca, negra e mulatos do Instituto do Coração (InCor) do HC-FMUSP, encontrando variações, respectivamente, de 0,5 a 3,7% e 7,5 a 16,3%. Os resultados obtidos na presente casuística estão de acordo com esses dados (Tabela 13).

**TABELA 13 – FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D DO GENE *HFE* NA POPULAÇÃO BRASILEIRA GERAL E COM EHNA**

<b>AUTOR ANO</b>	<b>n</b>	<b>POPULAÇÃO ESTUDADA</b>	<b>C282Y</b>	<b>H63D</b>
AGOSTINHO et al., 1999	247	Brasileiros de etnias branca, negra e mulatos de diferentes regiões	1,1 a 1,4%	6,4 a 20,3%
PEREIRA et al., em publicação	395	Brasileiros de etnias branca, negra e mulatos, doadores de sangue do InCor	0,5 a 3,7%	7,5 a 16,3%
<b>HC-FMUSP, 2000</b>	<b>31</b>	<b>Brasileiros com EHNA (n=31)</b>	<b>1,6%</b>	<b>14,5%</b>

Esses resultados contrapõem-se aos relatos de GEORGE et al. (1998) e de BONKOVSKY et al. (1999), mas compatibilizam-se com a escassez de siderose detectada nos tecidos hepáticos da casuística.

A paciente EAO, portadora homocigota da mutação H63D, apresentou parâmetros bioquímicos de perfil de ferro compatíveis com HH. Entretanto, a morfologia de esteato-hepatite típica, sem siderose à coloração de Perls, foi associada a obesidade e hiperlipidemia. Além disso, esse genotipo pode ocorrer em indivíduos sãos (ADAMS, 1999), de maneira que o diagnóstico de HH tornou-se pouco provável.

O fenômeno hiperferritinemia em associação com a síndrome de resistência à insulina e com a siderose tecidual hepática vem sendo descrito na literatura (MENDLER et al., 1999). Entretanto, os pacientes com EHNA estudados apresentaram apenas os dois primeiros itens, isto é, a hiperferritinemia em dez casos e a síndrome de resistência à insulina,

representada por obesidade, diabetes ou hiperlipidemia em 25 casos, entretanto, a siderose hepática não foi notória. É possível que essa diferença observada seja atribuível às origens das populações estudadas, já que em ambos os estudos, a média das idades situava-se entre a quinta e sexta década de vida, mas no de MENDLER et al. (1999) a pesquisa foi desenvolvida entre caucasianos franceses. O papel da hiperferritinemia sérica nos pacientes com síndrome de resistência à insulina, não necessariamente associada a deposição de pigmento férrico no fígado, deve ser melhor investigado.

A heterogeneidade das características dos pacientes estudados e dos citados na literatura sugere que EHNA seja um diagnóstico genérico, a via comum de diferentes condições patológicas. A série do HC-FMUSP reuniu os diversos perfis descritos para pacientes com EHNA: as mulheres de meia-idade, obesos, hiperlipidêmicos e diabéticos, os homens jovens sem esses fatores, os casos relacionados a drogas e a toxicidade ambiental profissional. Mas, ao invés dos relatos prévios, em nosso meio, a deposição de ferro em tecido hepático e as mutações do gene *HFE* não se revelaram significantes para os portadores de EHNA.

Os casos que preencheram os critérios mínimos, mas não se enquadraram perfeitamente nos padrões epidemiológicos, clínicos e morfológicos clássicos de EHNA, como dos pacientes JZS, GTEF e SS, poderão futuramente constituir classes diferentes, dentro da gama da 'esteatose hepática não alcoólica'. Por outro lado, casos que não preencheram critérios mínimos de EHNA, mas que poderiam se constituir

numa fase inicial da hepatopatia, como o da paciente IBS à época da primeira biópsia, poderão vir a serem reconhecidos mais precocemente.

O tema EHNA vem despertando interesse crescente na literatura, mas à exceção da dieta hipocalórica e exercícios físicos com perda de massa corpórea (ERIKSSON et al., 1986; UENO et al., 1997), nenhum tratamento proposto, como uso de antibacterianos (DRENICK et al., 1982), ácido ursodeoxicólico (LAURIN et al., 1996), hipoglicemiantes orais (COYLE et al., 1999) ou vitamina E (KUGELMAS et al., 1999), comprovou-se definitivamente eficaz. Mesmo com o transplante hepático, a EHNA pode reincidir no órgão implantado (CZAJA, 1997). Faz-se necessário, doravante, aumentar a casuística do HC-FMUSP, consolidar o conhecimento a respeito dos perfis de pacientes, e inserir esta entidade no contexto das esteatoses hepáticas mais claramente. As peculiaridades genéticas e ambientais brasileiras deverão enriquecer a visão científica atual. Com base no conhecimento da diversidade de condições que proporcionam o estabelecimento da EHNA, espera-se desenvolver, nos próximos tempos, formas de tratamento mais eficazes.



## 5. CONCLUSÕES

---

- 5.1** As menores freqüências de sexo feminino, obesidade, diabetes mellitus e hiperlipidemia em relação às primeiras séries de EHNA publicadas confirmam a reconceituação da doença quanto ao perfil de pacientes acometidos.
- 5.2**A ausência de etnia negra na casuística estudada sugere uma variação de comportamento da doença relacionada a esse aspecto.
- 5.3**Pacientes assintomáticos e com elevações discretas nos níveis de enzimas hepáticas podem apresentar alterações estruturais histopatológicas hepáticas avançadas.
- 5.4** A alanina aminotransferase pareceu ser, dentre as enzimas hepáticas, o melhor parâmetro de detecção da EHNA.
- 5.5**A relação AST/ALT inferior a dois, e preferencialmente inferior a um, deve sugerir o diagnóstico de EHNA, diferenciando-a da esteato-hepatite alcoólica.
- 5.6**A atividade necroinflamatória apresentou correlação estatisticamente significativa com a fibrose perivenular, sugerindo a participação do processo de agressão inflamatória na gênese das alterações hepáticas.

**5.7** A escassez de siderose hepática e as frequências das mutações do gene *HFE* em níveis compatíveis com as da população geral sugerem que, em nosso meio, o cenário genético da EHNA seja diferente, e a sobrecarga de ferro não desempenhe papel significativo na patogênese desta doença.

## 6. ANEXOS

---

**ANEXO 1 - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A  
PESQUISA (OU A SEU REPRESENTANTE LEGAL):**

Pouco se sabe sobre “esteato-hepatite não alcoólica”: por quê acontece, como se trata. Por isso, queremos conhecer melhor as pessoas que têm essa alteração no fígado.

Para isso, é preciso que o senhor(a) informe-nos com precisão, todos os dados que solicitarmos a respeito de sua saúde. Asseguramos-lhe que o seu atendimento neste serviço prosseguirá independentemente do teor de suas respostas.

Além disso, é preciso que o senhor(a) forneça uma amostra de seu sangue, que ficará guardada em nossos laboratórios. Será utilizada para exames, sempre dentro das normas éticas mundialmente aceitas.

Sua participação é de grande importância para o avanço dos conhecimentos da “esteato-hepatite” em nosso meio.

Ciente, e de acordo:

(nome e assinatura do paciente)

---

(nome e assinatura do pesquisador)

---

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**ANEXO 2 – REAGENTES E SUAS CONCENTRAÇÕES PARA  
AMPLIFICAÇÃO DO DNA , NA PESQUISA DE MUTAÇÕES  
DO GENE *HFE***

MATERIAIS	CONCENTRAÇÕES FINAIS	
	C282Y	H63D
Tampão para PCR	1 x	1 x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 Mm	1,5 mM
dNTPs	0,2 Mm	0,2 mM
'Primers' G845A (3'5' e 5'3')	0,6 µM	-
'Primers' C187G (3'5' e 5'3')	-	0,6 µM
DNA	200 ng	800 ng

**ANEXO 3- SEQÜÊNCIAS DE BASES DOS 'PRIMERS' UTILIZADOS**

'PRIMERS'	SEQÜÊNCIAS
G845A 3'5'	CTC.AGG.CAC.TCC.TCT.CAA.CC
G845A 5'3'	TGG.CAA.GGG.TAA.ACA.GAT.CC
C187G 3'5'	GCC.ACA.TCT.GGC.TTG.AAA.TT
C187G 5'3'	ACA.TGG.TTA.AGG.CCT.GTT.GC

**ANEXO 4 - PROVENIÊNCIA DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS  
REAÇÕES DE PESQUISA DAS MUTAÇÕES GENÉTICAS**

REAGENTE	LABORATÓRIO, CIDADE, PAÍS
Ácido acético glacial	Merck, RJ, Brasil
Agarose	Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA
Agarose NuSieve® GTG	FMC BioProducts Rockland, ME, USA
Água Milli Q	Millipore, Bedford, MA, EUA
Brometo de Etídio	Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA
Desoxiadenosina trifosfato (dATP) 2 mM	Gibco BRL, NY, EUA
Desoxicitosina trifosfato (dCTP) 2mM	Gibco BRL, NY, EUA
Desoxiguanidina trifosfato (dGTP) 2mM	Gibco BRL, NY, EUA
Desoxitimidina trifosfato (dTTP) 2mM	Gibco BRL, NY, EUA
EDTA Titriplex III	Sigma Chemical Company, St.Louis, EUA
Enzima de restrição <i>Bcl</i> I	New England, Biolabs, MA, EUA
Enzima de restrição <i>Sna</i> B I	New England, Biolabs, MA, EUA
HCl	Merck, RJ, Brasil
KCl	Merck, RJ, Brasil
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	Merck, Alemanha
NaCl	Sigma Chemical Co., St. .Louis, EUA
NaOH	Merck, Alemanha
Seqüências de 'primers'	Life Technologies, EUA
Taq polimerase 5U	CENBIOT/RS, RS, Brasil
Termociclador térmico PTC-100™	MJ Research, Inc., MA, EUA
Tris base	Gibco BRL, NY, EUA

**ANEXO 5 - PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES  
DE PESQUISA DAS MUTAÇÕES DO GENE *HFE***

(1 de 2)

**BROMETO DE ETÍDIO (10 mg/ml):**

Brometo de etídio.....1 g  
Água bidestilada..... 100 ml  
Guardar a 4°C ao abrigo de luz.

**CLORETO DE MAGNÉSIO (Mg Cl<sub>2</sub>) 2M:**

MgCl<sub>2</sub>.....203,3 g  
Água Milli Q.. 400 ml  
Agitar até dissolução completa, acertar o volume para 1000 ml, autoclavar e guardar a 4°C.

**CLORETO DE SÓDIO (NaCl) 3M**

NaCl.....175,2 g  
Água Milli Q...800 ml  
Agitar até dissolução completa, acertar o volume para 1000 ml, autoclavar e guardar a 4°C.

**DESOXI-NUCLEOTÍDEOS TRIFOSFATO (dNTPS):**

Desoxiadenosina trifosfato (dATP).....2,5 mM  
Desoxicitosina trifosfato (dCTP).....2,5 mM  
Desoxiguanidina trifosfato (dGTP).....2,5 mM  
Desoxitimidina trifosfato (dTTP).....2,5 mM

**EDTA 0,4 M pH 8:**

EDTA (Titriplex III).....148,9 g  
Água Milli Q.....800 ml  
Agitar vigorosamente com aquecimento até 45°C, ajustar o pH com pastilhas de NaOH até pH 8, acertar o volume para 1000 ml e autoclavar.

**GEL DE AGAROSE 1,2%:**

Agarose.....3,6 g  
Tampão TEA (1x) qsp.....300 ml.

(continua)



**ANEXO 5 – continuação**

(2 de 2)

**TAMPÃO PARA PCR 10 VEZES CONCENTRADO (10X)**

Cloreto de Potássio (KCl).....500 mM

Tris - HCl pH 9,0.....100 mM

Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>)..... 15 mM**TAMPÃO TRIS-EDTA-ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL (TEA) (50x)**

TRIS base.....242 g

Água Milli Q.....600 ml

Ácido acético glacial.....57,1 ml

EDTA 0,4 M pH 8.....125 ml

Ajustar para pH 8,3, acertar o volume para 1000 ml, autoclavar.

**TRIS-HCl 2M (pH 8 - 7.6 - 7.4):**

TRIS base.....242,2 g

Água Milli Q.....800 ml

Agitar até dissolução completa, acertar o pH com HCl fumegante.

pH 7,4.....70 ml

pH 7,6.....60 ml

pH 8,0.....42 ml

Acertar o volume para 1000 ml, autoclavar e guardar a 4°C.

## ANEXO 6 - EHNA: PERFIL CLÍNICO (PARTE 1)

CASO	BIÓPSIA (mês/ano)	IDADE (anos)	SEXO	ETNIA	QUADRO CLÍNICO RELACIONADO A EHNA
AMAS	11/1993	47	F	B/N	Ausente
ASS	02/1999	45	M	B/N	hepatomegalia de 3 cm
AJS	11/1996	47	F	B/A	síndrome dispéptica
CAC	09/1997	33	M	B	Ausente
DAA	03/1998	56	F	B	Ausente
ESS	06/1999	55	F	A	Ausente
EAO	09/1997	36	F	B	síndrome dispéptica
ECP	05/1999	74	F	B	hepatomegalia de 2 cm
GTEF	10/1998	32	M	B	Ausente
IBS	03/1999	55	F	B	dor em hipocôndrio direito hepatomegalia de 7 cm
JFA	06/1995	48	F	B	Ausente
JBS	02/1998	50	M	B	Ausente
JCS	02/1998	40	M	B	Ausente
JZS	07/1997	38	M	B	Ausente
KT	04/1999	65	M	A	Ausente
LCMN	09/1997	38	M	B	síndrome dispéptica
LCP	07/1995	59	F	B	dor em hipocôndrio direito síndrome dispéptica
MAS	05/1996	51	F	B/N	dor em hipocôndrio direito síndrome dispéptica
MCCC	10/1998	45	F	B	síndrome dispéptica
MNB	09/1996	61	F	B/N	dor em hipocôndrio direito síndrome dispéptica
MEMC	12/1998	45	F	B	dor em hipocôndrio direito hepatomegalia de 9 cm síndrome dispéptica
MELP	05/1999	52	F	B	Assintomático
MEF	05/1996	46	F	B	dor em hipocôndrio direito hepatomegalia de 8 cm síndrome dispéptica
MN	09/1998	39	M	B	síndrome dispéptica
NB	01/1998	42	F	B	Ausente
PVS	01/1998	40	M	B	Ausente
RF	09/1996	47	M	B	Ausente
RMO	01/1998	47	F	B	ausente
SS	05/1998	60	M	A	Ausente
SAA	08/1999	48	M	B	Ausente
TA	08/1999	71	F	A	Ausente
ZMM	04/1999	63	F	B	dor em hipocôndrio direito hepatomegalia de 3 cm

NOTA: A hepatomegalia foi medida em cm abaixo do rebordo costal direito, em linha hemiclavicular. M: masculino, F: feminino; B: branca, N: negra, A: asiática.

## ANEXO 7 – EHNA: PERFIL CLÍNICO (PARTE 2)

CASO	OBESI- DADE	HIPER- LIPIDEMIA	DIABETES MELLITUS	USO DE MEDICAMENTOS, OUTROS ANTECEDENTES RELACIONADOS A EHNA
AMAS	sim	sim	não	prednisona
ASS	sim	sim	não	ausentes
AJS	não	sim	não	ausentes
CAC	não	sim	não	inalação de gases industriais
DAA	sim	sim	sim	ausentes
ESS	não	sim	sim	ausentes
EAO	sim	sim	não	ausentes
ECP	não	não	não	ausentes
GTEF	não	não	não	ausentes
IBS	não	sim	sim	ausentes
JFA	sim	sim	sim	ausentes
JBS	não	não	não	amiodarona
JCS	não	sim	não	inalação de gases industriais
JZS	não	não	não	inalação de gases industriais
KT	não	sim	não	ausentes
LCMN	não	não	não	ausentes
LCP	sim	não	não	amiodarona
MAS	não	sim	sim	ausentes
MCCC	sim	sim	sim	ausentes
MNB	sim	sim	não	ausentes
MEMC	não	não	não	ausentes
MELP	sim	não	não	ausentes
MEF	sim	sim	sim	ausentes
MN	não	não	não	enterectomia extensa
NB	sim	não	não	ausentes
PVS	sim	não	não	ausentes
RF	sim	sim	não	ausentes
RMO	sim	não	não	ausentes
SS	não	não	sim	ausentes
SAA	sim	não	não	ausentes
TA	não	sim	sim	ausentes
ZMM	sim	não	sim	ausentes

NOTA: os antecedentes de inalação de gases industriais referem-se a funcionários de indústria siderúrgica que referiram exposição profissional a substâncias voláteis de natureza não esclarecida

## ANEXO 8 – EHNA: PERFIL CLÍNICO (PARTE 3)

(1 de 2)

CASO	DROGAS NÃO RELACIONADAS A EHNA	ANTECEDENTES PESSOAIS	ANTECEDENTES FAMILIARES
AMAS	cloroquina	hipertireoidismo lupus eritematoso sistêmico	ausentes
ASS	alfa-metildopa captopril nifedipina	hipotireoidismo	pai: cirrose alcoólica
AJS	ausentes	hipotireoidismo	ausentes
CAC	ausentes	ausentes	ausentes
DAA	alfa-metildopa clorpropamida fluoxetina hidroclortiazida levotiroxina	depressão HAS hipotireoidismo	ausentes
ESS	metotrexate doxorrubicina ciclofosfamida 5-fluoracil losartan	carcinoma de timo HAS	ausentes
EAO	hidroclortiazida nifedipina	CCC HAS	ausentes
ECP	etanol 10 g ao dia	hiperparatireoidismo HAS	ausentes
GTEF	ausentes	infecção por <i>Herpes zoster</i>	ausentes
IBS	bezafibrato nifedipina lovastatina	úlcera duodenal esteatose hepática simples	ausentes
JFA	captopril colestiramina glibenclamida insulina propranolol	HAS	irmão, tio, avô: cirrose alcoólica
JBS	ausentes	HAS imunodeficiência de IgM	ausentes
JCS	ausentes	ausentes	ausentes
JZS	ausentes	ausentes	ausentes
KT	trandolapril diltiazem AINE	artrite gotosa HAS	ausentes
LCMN	ausentes	insuficiência coronariana atopia transplante de córnea	ausentes

continua

## ANEXO 8 – EHNA: PERFIL CLÍNICO (PARTE 3)

(2 de 2)

CASO	DROGAS NÃO RELACIONADAS A EHNA	ANTECEDENTES PESSOAIS	ANTECEDENTES FAMILIARES
LCP	ausentes	ausentes	ausentes
MAS	ausentes	ausentes	ausentes
MCCC	ausentes	ausentes	ausentes
MNB	ausentes	CCC	ausentes
MEMC	ausentes	ausentes	ausentes
MELP	AINE alfa-metildopa amiloride hidroclortiazida propranolol	HAS hipotireoidismo lombalgia crônica úlcera gástrica	ausentes
MEF	clorpropamida hidroclortiazida reserpina	gamopatia monoclonal	mãe: cirrose de etiologia indeterminada
MN	AUDC loperamida cetotifeno metronidazol	síndrome do intestino curto	ausentes
NB	ausentes	HAS	ausentes
PVS	ausentes	ausentes	ausentes
RF	ausentes	nefrolitíase hemotransfusão	ausentes
RMO	ausentes	ausentes	ausentes
SS	hidroclortiazida nifedipina	ausentes	ausentes
SAA	ausentes	poliartralgia	pai: cirrose por hemocromatose
TA	amitriptilina captopril glibenclamida insulina	ausentes	ausentes
ZMM	ausentes	ausentes	ausentes

Nota: AUDC: ácido ursodesoxicólico; AINE: anti-inflamatórios não esteroidais; HAS: hipertensão arterial sistêmica; CCC: colecistopatia crônica calculosa.

## ANEXO 9 – EHNA: PERFIL LABORATORIAL (PARTE 1)

CASO	AST (xVN)	ALT (xVN)	AST/ ALT	FA (xVN)	GGT (xVN)	BD (mg/dL)	BI (mg/dL)
AMAS	2,1	2,7	0,8	4,3	5,1	0,1	0,4
ASS	1,3	1,6	0,8	0,8	1,0	0,4	0,1
AJS	2,6	4,8	0,5	1,3	7,4	0,1	0,5
CAC	1,8	4,0	0,5	0,7	1,9	0,4	0,6
DAA	3,0	4,7	0,6	0,3	2,6	0,1	0,6
ESS	2,1	2,6	0,8	0,7	1,1	0,2	0,1
EAO	1,0	2,2	0,5	0,7	1,0	0,2	0,5
ECP	4,7	2,8	1,7	1,5	7,4	0,3	0,8
GTEF	0,7	1,9	0,4	0,8	0,4	0,2	0,4
IBS	2,6	2,0	1,3	1,8	16,3	0,2	0,2
JFA	1,9	3,4	0,6	0,7	4,39	0,4	0,8
JBS	0,9	1,1	0,8	0,4	0,9	0,5	0,4
JCS	1,2	1,9	0,6	0,8	0,4	0,3	0,4
JZS	0,8	1,2	0,7	0,7	1,0	0,3	0,4
KT	1,5	2,2	0,7	0,8	1,1	0,2	0,5
LCMN	1,1	3,6	0,3	0,6	1,1	0,2	0,4
LCP	0,8	1,6	0,5	0,8	1,1	0,2	0,5
MAS	1,4	1,1	1,3	0,7	1,3	0,1	0,4
MCCC	1,6	2,4	0,7	0,8	2,7	0,1	0,4
MNB	1,4	1,2	1,2	0,8	1,0	0,1	0,6
MEMC	1,8	4,0	0,5	1,1	1,0	0,4	0,4
MELP	2,1	1,8	1,2	0,6	1,9	0,4	2,2
MEF	2,6	1,7	1,5	1,3	2,4	0,1	0,5
MN	0,9	1,5	0,6	1,0	1,7	0,2	0,9
NB	1,2	3,2	0,4	0,5	0,8	0,1	0,4
PVS	2,2	4,5	0,5	0,5	2,1	0,4	2,7
RF	1,8	3,5	0,5	0,5	1,2	0,2	1,1
RMO	0,6	1,0	0,6	0,9	2,5	0,2	0,4
SS	1,9	1,9	1	1,0	1,1	0,2	0,6
SAA	1,4	2,4	0,6	0,4	0,9	0,2	0,6
TA	1,5	1,7	0,9	0,8	1,1	0,1	0,5
ZMM	1,1	1,3	0,8	1,6	3,2	0,2	0,4

NOTA: **xVN**: vezes em relação ao limite superior normal; **AST**: aspartato aminotransferase; **ALT**: alanina aminotransferase; **FA**: fosfatase alcalina; **GGT**: gama-glutamilttransferase; **BD**: bilirrubina direta; **BI**: bilirrubina indireta.

## ANEXO 10 – EHNA: PERFIL LABORATORIAL (PARTE 2)

CASO	Alb (g/dL)	TP (%)	Ferritina (xVN)	Sat Transf (%)	Hb (g/dL)	Ht (%)
AMAS	2,4	96	2,4	23	13	41,4
ASS	4,3	79	0,9	34	15,1	44,6
AJS	5,1	97	0,5	21	13,7	40,5
CAC	4,5	77	0,9	47	16,7	48,8
DAA	4,4	80	3,2	28	15,1	44,0
ESS	3,9	102	3,6	30	14,9	44,5
EAO	4,4	97	3,1	58	15,5	45,8
ECP	3,8	68	0,1	45	14,4	42,8
GTEF	4,8	100	0,5	54	15,8	46,0
IBS	4,7	74	2,0	19	14,6	45,3
JFA	4,9	81	3,0	51	15,2	45,3
JBS	3,6	82	0,1	51	16,4	47,6
JCS	4,9	83	2,3	32	16,4	48,0
JZS	5,3	88	0,6	31	15,7	47,0
KT	4,5	110	0,8	21	16,1	47,3
LCMN	4,5	95	0,2	13	15,4	44,7
LCP	4,2	110	0,5	29	14,9	44,5
MAS	4,3	90	0,6	30	14,1	41,7
MCCC	4,6	110	0,2	20	13,2	40,0
MNB	4,0	86	0,4	17	14,5	44,0
MEMC	5,0	100	0,1	25	12,8	39,0
MELP	4,6	49	0,9	41	16,3	47,0
MEF	4,1	85	0,3	21	13,5	41,0
MN	5,2	96	0,7	45	15,7	45,4
NB	4,3	108	0,8	51	15,7	45,9
PVS	4,6	75	0,6	37	17,6	50,1
RF	5,0	78	0,9	19	16,9	49,8
RMO	3,1	87	0,2	21	14	43,0
SS	4,5	89	2,5	55	15,8	47,0
SAA	3,8	93	3,1	33	15,6	45,0
TA	3,8	79	0,8	27	15,4	46,0
ZMM	3,7	96	2,8	30	14	40,8

NOTA: **xVN**: número de vezes o valor máximo normal; **Alb**: albuminemia; **TP**: tempo de protrombina; **Sat Trans**: saturação de ferro da transferrina; **Hb**: hemoglobina; **Ht**: hematócrito.

**ANEXO 11 - EHNA: PERFIL HISTOPATOLÓGICO**

(1 de 6)

<b>VARIÁVEIS E ESTADIAMENTO</b>	<b>AMAS</b>	<b>ASS</b>	<b>AJS</b>	<b>CAC</b>	<b>DAA</b>	<b>ESS</b>
<b>ALTERAÇÕES HEPATOCELULARES</b>						
<b>ESTEATOSE</b>						
MACROVESICULAR	3	3	4	4	3	2
MICROVESICULAR	1	0	2	1	1	2
<b>MALLORY</b>						
ZONA 3 (OU GERAL* )	1	0	2	0	3	2
ZONAS 2 e 1	0	0	0	0	1	0
VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR	1	1	2	3	1	3
CÉLULAS CLARAS	2	0	1	2	2	1
NECROSE FOCAL	2	2	2	2	1	3
METAPLASIA DUCTAL	0	0	0	0	2	0
OUTROS	C	-	-	-	M C L	-
<b>FIBROSE</b>						
PERIVENULAR (OU GERAL*)	1	2	1	1	3	3
PERICELULAR	2	0	2	1	4	3
PORTAL	1	2	0	2	2	1
SEPTAL	1	1	0	1	3	1
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>						
LMN DE ZONA 3 (OU PARENQUIMATOSO*)	1	0	1	1	1	1
PMN DE ZONA 3 (OU PARENQUIMATOSO*)	1	1	2	3	3	4
LMN de zona 1 (OU SEPTAL*)	2	1	0	2	2	2
PMN de zona 1 (OU SEPTAL*)	1	0	0	2	1	1
<b>PIGMENTOS</b>						
<b>SIDEROSE</b>						
CÉLULAS DE KUPFFER	0	0	0	0	0	0
HEPATÓCITOS	0	0	0	0	0	0
PERIportal	0	0	0	0	0	0
<b>ESTADIAMENTO</b>						
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	2	2	1	2	3	2
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA	1	1	2	3	3	3
ATIVIDADE PERIportal	0	0	0	1	0	0

continua



**ANEXO 11 – EHNA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

(2 de 6)

<b>VARIÁVEIS E ESTADIAMENTO</b>	<b>EAO</b>	<b>ECP</b>	<b>GTE</b>	<b>IBS</b>	<b>JFA</b>	<b>JFA*</b>
			<b>F</b>			
<b>ALTERAÇÕES HEPATOCELULARES</b>						
<b>ESTEATOSE</b>						
MACROVESICULAR	4	3	3	3	4	1
MICROVESICULAR	1	2	1	1	1	0
<b>MALLORY</b>						
ZONA 3	1	3	0	4	3	-
ZONAS 2 E 1	0	1	0	4	3	-
<b>VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR</b>						
CÉLULAS CLARAS	1	2	0	4	3	3
NECROSE FOCAL	0	3	0	2	1	2
METAPLASIA DUCTAL	0	3	0	0	2	4
OUTROS	-	-	-	-	-	-
<b>FIBROSE</b>						
PERIVENULAR (OU GERAL*)	1	4	1	3	4	-
PERICELULAR	0	3	0	4	4	-
PORTAL	0	3	0	3	3	-
SEPTAL	0	3	0	2	3	-
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>						
LMN DE ZONA 3 (OU GERAL*)	0	1	0	0	1	2
PMN DE ZONA 3 (OU GERAL*)	1	4	1	2	4	3
LMN de zona 1	0	2	0	2	1	-
PMN de zona 1	0	2	0	2	4	-
<b>PIGMENTOS</b>						
<b>SIDEROSE</b>						
CÉLULAS DE KUPFFER	0	0	2	0	0	0
HEPATÓCITOS	0	0	2	0	0	0
PERIportal	0	0	0	0	0	0
<b>ESTADIAMENTO</b>						
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	1	4	1	3	4	4
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA	1	4	1	2	4	4
ATIVIDADE PERIportal	0	2	0	1	2	3

continua

**ANEXO 11 – EHNA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

(3 de 6)

<b>VARIÁVEIS E ESTADIAMENTO</b>	<b>JBS</b>	<b>JCS</b>	<b>JZS</b>	<b>KT</b>	<b>LCM</b>	<b>LCP</b>
					<b>N</b>	
<b>ALTERAÇÕES HEPATOCELULARES</b>						
<b>ESTEATOSE</b>						
MACROVESICULAR	3	3	3	2	3	3
MICROVESICULAR	0	1	4	1	0	2
<b>MALLORY</b>						
ZONA 3	0	1	2	0	2	2
ZONAS 2 E 1	0	0	2	0	0	0
VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR	0	2	2	2	2	1
CÉLULAS CLARAS	2	1	3	2	2	2
NECROSE FOCAL	1	1	2	0	1	3
METAPLASIA DUCTAL	1	0	2	0	0	0
OUTROS	-	-	-	-	-	-
<b>FIBROSE</b>						
PERIVENULAR	3	1	3	2	1	2
PERICELULAR	2	0	2	1	1	2
PORTAL	1	0	3	0	1	0
SEPTAL	3	0	4	0	2	0
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>						
LMN DE ZONA 3	1	0	1	0	0	0
PMN DE ZONA 3	2	1	2	2	1	3
LMN de zona 1	2	2	2	0	1	3
PMN de zona 1	0	0	1	0	0	1
<b>PIGMENTOS</b>						
<b>SIDEROSE</b>						
CÉLULAS DE KUPFFER	0	0	0	0	0	0
HEPATÓCITOS	0	0	0	0	0	0
PERIportal	0	0	0	0	0	0
<b>ESTADIAMENTO</b>						
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	3	1	4	1	2	1
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA	1	1	2	1	1	2
ATIVIDADE PERIportal	1	0	2	0	0	0

continua

**ANEXO 11 – EHNA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

(4 de 6)

<b>VARIÁVEIS E ESTADIAMENTO</b>	<b>MAS</b>	<b>MCCC</b>	<b>MNB</b>	<b>MEMC</b>	<b>MELP*</b>
<b>ALTERAÇÕES HEPATOCELULARES</b>					
<b>ESTEATOSE</b>					
MACROVESICULAR	3	4	4	3	3
MICROVESICULAR	1	1	2	0	0
<b>MALLORY</b>					
ZONA 3 (OU GERAL* )	1	1	3	2	-
ZONAS 2 E 1	0	1	1	0	-
VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR	1	1	2	0	1
CÉLULAS CLARAS	1	3	2	0	3
NECROSE FOCAL	1	1	1	1	2
METAPLASIA DUCTAL	0	1	0	0	2
OUTROS	L	-	-	-	-
<b>FIBROSE</b>					
PERIVENULAR	1	2	1	2	-
PERICELULAR	0	2	1	2	-
PORTAL	0	0	0	2	-
SEPTAL	0	1	1	1	-
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>					
LMN DE ZONA 3 (OU GERAL*)	1	3	1	1	3
PMN DE ZONA 3 (OU GERAL*)	1	2	1	2	3
LMN de zona 1	2	2	2	0	-
PMN de zona 1	2	1	2	0	-
<b>PIGMENTOS</b>					
<b>SIDEROSE</b>					
CÉLULAS DE KUPFFER	0	0	0	0	0
HEPATÓCITOS	0	0	0	0	0
PERIportal	0	0	0	0	0
<b>ESTADIAMENTO</b>					
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	1	2	1	2	4
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA	1	3	3	2	3
ATIVIDADE PERIportal	0	0	0	0	2

continua

**ANEXO 11 – EHNA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

(5 de 6)

<b>VARIÁVEIS E ESTADIAMENTO</b>	<b>MEF</b>	<b>MN</b>	<b>NB</b>	<b>PVS</b>	<b>RF</b>
<b>ALTERAÇÕES HEPATOCELULARES</b>					
<b>ESTEATOSE</b>					
MACROVESICULAR	4	2	2	3	3
MICROVESICULAR	0	1	0	2	1
<b>MALLORY</b>					
ZONA 3	3	1	1	1	0
ZONAS 2 E 1	1	0	0	0	0
VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR	1	2	1	0	1
CÉLULAS CLARAS	3	1	1	1	1
NECROSE FOCAL	1	1	1	2	1
METAPLASIA DUCTAL	1	0	0	0	0
OUTROS	-	-	-	-	L
<b>FIBROSE</b>					
PERIVENULAR	3	1	1	1	1
PERICELULAR	2	0	0	0	1
PORTAL	2	1	2	0	0
SEPTAL	1	0	1	0	0
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>					
LMN DE ZONA 3	0	1	1	1	0
PMN DE ZONA 3	2	1	1	2	1
LMN DE ZONA 1	2	1	1	1	0
PMN DE ZONA 1	2	2	2	1	0
<b>PIGMENTOS</b>					
<b>SIDEROSE</b>					
CÉLULAS DE KUPFFER	0	0	0	0	0
HEPATÓCITOS	0	0	0	0	0
PERIportal	0	0	0	0	0
<b>ESTADIAMENTO</b>					
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	2	2	2	1	1
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA	3	1	1	1	1
ATIVIDADE PERIportal	0	0	0	0	0

**ANEXO 11 – EHNA: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

(6 de 6)

<b>VARIÁVEIS E ESTADIAMENTO</b>	<b>RMO</b>	<b>SS</b>	<b>SAA</b>	<b>TA</b>	<b>ZMM</b>
<b>ALTERAÇÕES HEPATOCELULARES</b>					
<b>ESTEATOSE</b>					
MACROVESICULAR	2	3	3	3	3
MICROVESICULAR	0	2	1	1	1
<b>MALLORY</b>					
ZONA 3	2	4	1	3	3
ZONAS 2 E 1	0	2	0	1	3
<b>VACUOLIZAÇÃO NUCLEAR</b>					
CÉLULAS CLARAS	3	3	1	3	3
NECROSE FOCAL	1	1	1	2	1
METAPLASIA DUCTAL	2	2	0	2	2
OUTROS	-	-	-	C	-
<b>FIBROSE</b>					
PERIVENULAR	2	4	1	4	3
PERICELULAR	1	3	0	3	2
PORTAL	3	2	1	2	4
SEPTAL	1	2	0	3	4
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>					
LMN DE ZONA 3	1	1	1	1	1
PMN DE ZONA 3	3	3	1	3	4
LMN DE ZONA 1	3	3	1	2	2
PMN DE ZONA 1	1	2	1	1	1
<b>PIGMENTOS</b>					
<b>SIDEROSE</b>					
CÉLULAS DE KUPFFER	0	1	3	0	0
HEPATÓCITOS	0	1	1	0	0
PERIportal	0	1	0	0	0
<b>ESTADIAMENTO</b>					
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	4	3	3	3	4
ATIVIDADE NECROINFLAMATÓRIA	3	3	3	3	3
ATIVIDADE PERIportal	2	2	2	0	2

Nota: LMN= linfomonocitário; PMN= polimorfonucleares; L= lipogranulomas;  
C= corpúsculos de Councilman; M= megamitocôndria

\* Pacientes com cirrose hepática.

## ANEXO 12 – EHNA: PERFIL DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D

PACIENTE	C282Y	H63D
AMAS	sem mutação	sem mutação
ASS	sem mutação	sem mutação
AJS	sem mutação	sem mutação
CAC	sem mutação	heterozigoto
DAA	sem mutação	sem mutação
ESS	sem mutação	heterozigoto
EAO	sem mutação	homozigoto
ACP	sem mutação	heterozigoto
GTEF	sem mutação	sem mutação
IBS	heterozigoto	sem mutação
JFA	sem mutação	sem mutação
JBS	sem mutação	sem mutação
JCS	não pesquisado	não pesquisado
JZS	sem mutação	sem mutação
KT	sem mutação	sem mutação
LCMN	sem mutação	sem mutação
LCP	sem mutação	sem mutação
MAS	sem mutação	sem mutação
MCCC	sem mutação	sem mutação
MNB	sem mutação	sem mutação
MEMC	sem mutação	sem mutação
MELP	sem mutação	sem mutação
MEF	sem mutação	heterozigoto
MN	sem mutação	sem mutação
NB	sem mutação	heterozigoto
PVS	sem mutação	heterozigoto
RF	sem mutação	sem mutação
RMO	sem mutação	sem mutação
SS	sem mutação	sem mutação
SAA	sem mutação	heterozigoto
TA	sem mutação	sem mutação
ZMM	sem mutação	heterozigoto

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- ACOSTA, D.; WENZEL, D.G. Injury produced by free fatty acids to lysosomes and mitochondria in cultured heart muscle and endothelial cells. **Atherosclerosis**, v.20, p.417-26, 1974.
- ADAMS, P.C. Population screening for hemochromatosis. **Hepatology**, v. 29, n.4, p.1324-7, 1999.
- ADAMS, P.C.; VALDBERG, L.S. Evolving expression of hemochromatosis. **Semin. Liver Dis.**, v.16, p.47-54, 1996.
- ADLER, M.; SCHAFFNER, F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. **Am. J. Med.**, v.67, p.811-6, 1979.
- AGOSTINHO, M.F.; ARRUDA, V.R.; BASSERES, D.S.; BORDIN, S.; SOARES, M.C.P.; MENEZES, R.C.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O. Mutation analysis of the *HFE* gene in Brazilian Populations. **Blood Cells Mol. Dis.**, v.25, n.6, p.324-7, 1999.
- BACON, B.R.; FARAKVASH, M.J.; JANNEY, C.G.; NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v.107, p.1103-9, 1994.
- BACON, B.R.; POWELL, L.W., ADAMS, P.C.; KRESINA, T.F.; HOOFNAGLE, J.H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. **Gastroenterology**, v. 116, p.193-207, 1999.



- BALDRIDGE, A.D.; PEREZ-ATAYDE, A.R.; GRAEME-COOK, F.; HIGGINS, L.; LAVINE, J.E. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. **J. Pediatr.**, v.127, n.5, p.700-4, 1995.
- BARTON, J.C.; SHIH, W.W.; SAWADA-HIRAI, R.; ACTON, R.T.; HARMON, L.; RIVERS, C.; ROTHENBERG, B.E. Genetic and clinical description of hemochromatosis probands and heterozygotes: evidence that multiple genes linked to the major histocompatibility complex are responsible for hemochromatosis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v.23, p.135-45, 1997.
- BERSON, A.; DEBECO, V.; LETTÉRON, P.; ROBIN, M.A.; MOREAU, C.; KAHWAJI, J.E.; VERTHIER, N.; FELDMANN, G.; FROMENTY, B.; PESSAYRE, D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v.114, p.764-74, 1998.
- BEUTLER, E. The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. **Am. J. Hum. Genet.**, v.61, n.3, p.762-4, 1997.
- BIAVA, C. Mallory alcoholic hyalin: a heterofore unique lesion of hepatocellular ergastoplasm. **Lab. Invest.** v.13, p.301-20, 1964.
- BONKOVSKY, H.L.; JAWAID, Q.; TORTORELLI, K.; LECLAIR, P.; COBB, J.; LAMBRECHT, R.W.; BANNER, B.F.. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the *HFE* gene in non-alcoholic steatohepatitis. **J. Hepatol.**, v.31, p.421-9, 1999.

BRUNT, E.M.; JANNEY C.G.L; DI BISCEGLIE, A.M.; NEUSCHWANDER-TETRI B.A.; BACON B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am. J. Gastroenterol.** v.94, p.2467-74, 1999.

BURT, A.D.; MUTTON, A.; DAY, C.P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. **Semin. Diagn. Pathol.**, v.15, n.4, p.246-58, 1998.

BYRON, D.; MINUK, G.Y. Profile of an urban hospital-based practice. **Hepatology**, v.24, p. 813-815, 1996.

CABALLERÍA, J. Diagnóstico de alcoholismo. Marcadores biológicos. In: Rodés, J. y Chantar, C. **Actualidades en Gastroenterología y Hepatología.** JR Prous Editores, Barcelona, 1995. p.145-54.

CALDWELL, S.H.; OELSNER, D.H.; IEZZONI, J.C.; HESPENHEIDE, E.E.; BATTLE, E.H.; CRISCOLL, C. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. **Hepatology**, v. 29, p. 664-9, 1999.

COTRIM, H.P.; ANDRADE, Z.A.; PARANA, R.; PORTUGAL, M.L; LYRA, L.G.; FREITAS, L.A.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. **Liver**, v.19, p.299-304, 1999.

COYLE, W.J.; DELANEY, N.; YOSHIHASHI, A.; LAWSON, P. Metformin treatment in patients with nonalcoholic steatohepatitis normalizes LFTs and improves histology. [Abstract 20 A4]. Apresentado no DDW<sup>®</sup> Scientific Sessions, Orlando, Florida, 1999.

CZAJA, A.J. Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis after liver transplantation. **Liver Transplantation and Surgery**. v.3, n.2, p.185-6, 1997.

DATZ, C.; LALLOZ, M.R.A.; VOGEL, W.; GRAZIADEI, I.; HACKL, F.; VAUTIER, G.; LAYTON, D.M.; MAIER-DOBERSBERGER, T.; FERENCI, P.; PENNER, E.; SANDHOFER, F.; BOMFORD, A.; PAULWEBER, B. Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis. *J. Hepatol.*, v.27, p.773-9, 1997.

DAY, C.P.; JAMES, O.F.W. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? **Gastroenterology**, v.114, p.842-5, 1998(a).

DAY, C.P.; JAMES, O.F.W. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? **Hepatology**, v.27, p.1463-1466, 1998(b).

DAY, C.; YEAMAN, S. The biochemistry of alcohol-induced fatty liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1215, p.33-48, 1994.

DESCHAMPS, D.; DEBECO, V.; FISCH, C.; FROMENTY, B.; GUILLOUZO, A.; PESSAYRE, D. Inhibition by perhexiline of oxidative phosphorylation

and the  $\beta$ -oxidation of fatty acids: possible role in pseudoalcoholic liver lesions. **Hepatology**, v.19, p.948-61, 1994.

DIEHL, A.M.; POTTER, J.J.; BOITNOTT, J.; DUYN, M.A.; HERLONG, H.F.; MEZEY, E. Relationship between piridoxal 5'-phosphate deficiency and aminotransferase levels in alcoholic hepatitis. **Gastroenterology**, v.86, p.632-6, 1986.

DIEHL, A.M.; GOODMAN, Z.; ISHAK, K.G. Alcohollike disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. **Gastroenterology**; v.95, p.1056-62, 1988.

DRENICK, E.J.; FISLER, J.; JOHNSON, D. Hepatic steatosis after intestinal bypass – prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition. **Gastroenterology**, v.82, p.535-48, 1982.

DRENICK, E.J.; SIMMONS, F.; MURPHY, J.F. Hepatic morphology after treatment of obesity. **New Engl. J. Med.**, v. 282, p.829-4, 1970.

ERIKSSON, S.; ERIKSSON, K.F.; BONDESSON, L. Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. **Acta Med. Scand.**, v.220, p.83-8, 1986.

FALCHUK, K.R.; FISKE, S.C.; HAGGITT, R.C.; FEDERMAN, M.; TREY, C. Pericentral hepatic fibrosis and intracellular hyalin in diabetes mellitus. **Gastroenterology**, v.78, p.535-41, 1980.

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.;  
BASAVA, A.; DORMISHIAN, F.; DOMINGO, R. Jr; ELLIS, M.C.; FULLAN,  
A.; HINTON, L.M.; JONES, N.L.; KIMMEL, B.E.; KRONMAL, G.S.;  
LAUER, P.; LEE, V.K.; LOEB, D.B.; MAPA, F.A.; MCCLELLAND, E.;  
MEYER, N.C.; MINTIER, G.A.; MOELLER, N.; MOORE, T.; MORIKANG,  
E.; PRASS, C.E.; QUINTANA, L.; STARNES, S.M.; SCHATZMAN, R.C.;  
BRUNKE, K.J.; DRAYNA, D.T.; RISCH, N.J.; BACON, B.R.; WOLFF, R.K.  
A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary  
haemochromatosis. **Nat. Genet.**, v.13, p.399-408, 1996.

FEDER, J.N.; PENNY, D.M.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; LEBRON, J.A.;  
WATSON, N.; TSUCHIHASHI, Z.; SIGAL, E.L; BJORKMAN, P.J.;  
SCHATZMAN, R.C.. The hemochromatosis gene product complexes with  
the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. **Proc.  
Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.1472-7, 1998.

FEDER, J.N.; TSUCHIHASHI, Z.; IRRINKI, Z.; LEE, V.K.; MAPA, F.A.,  
MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; STARNES, S.M.; WOLFF R.K.;  
PARKKILA, S.; SLY, W.S.L SCHATZMAN, R.C. The hemochromatosis  
founder mutation in HLA-H disrupts  $\beta$ 2-microglobulin interaction and cell  
surface expression. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.1402-5, 1997.

FLINT, J.; HARDING, R.M.; CLEGG, J.B.; BOYCE, A.J. Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by molecular analysis of globin gene variants. **Hum. Genet.**, v.91, p.91-117, 1993.

FROMENTY, B.; PESSAYRE, D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. **J. Hepatol.**, v.26, Suppl. 2, p.43-53, 1997.

GEORGE, D.K.; GOLDWURM, S.; MACDONALD, G.A.; COWLEY, L.L.; WALKER, N.I.; WARD, P.J. JAZWINSKA, E.C.; POWELL, L.W. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. **Gastroenterology**, v.114, n.2, p.311-8, 1998.

GORDEUK, V.; MUKIIBI, J.; HASSTEDT, S.J.; Samowitz, W.; Edwards, C.Q.; West, G.; Ndambire, S.; Emmanuel, J.; Nkanza, N.; Chapanduka, Z.; Randall, M.; Boone, P.; Romano, P.; Martell, R.W.; Yamashita, T.; Effler, P.; Brittenham, G. Iron overload in Africa – interaction between a gene and dietary iron content. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p.95-100, 1992.

GRIMM, I.S.; SCHINDLER, W.; HALUZKA, O. Steatohepatitis and fatal hepatic failure after biliopancreatic diversion. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 87, n. 6, p. 775-9, 1992.

- GROVE, J.; DALY, A.K.; BASSENDINE, M.F.; DAY, C.P. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic, steatohepatitis. **Hepatology**, v.26, n.1, p.143-6, 1997.
- GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, C.; CARNINCI, P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques** v.11, n.3, p. 298-300, 1991.
- HAMILTON, D.L.; VEST, K.; BROWN, B.S.; SHAH, A.N.; MENGUY, R.B.; CHEY, W.Y. Liver injury with alcoholiclike hyalin after gastroplasty for morbid obesity. **Gastroenterology**, v.85, p. 722-6, 1983.
- HOCKING, M.P.; DUERSON, M.C.; O'LEARY, J.P.; WOODWARD, E.R. Jejunio-ileal bypass for morbid obesity: late follow up on 100 cases. **New Engl. J. Med.**, v.308, p.995-8, 1983.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico populacional**. Rio de Janeiro, 1997.
- INTERNATIONAL CONSENSUS MEETING. Criteria of drug-induced liver disorders, Paris, 1989. **J. Hepatol.**, v.11, p.272-6, 1990.
- ITOH, S.; TSUKADA, Y.; ICHINOE, A. Nonalcoholic fatty liver with alcoholic hyalin after long-term glucocorticoid therapy. **Acta Hepato-Gastroenterol.**, v.24, p.415-8, 1977.

ITOH, S.; YUGEL, T.; KAWAGOE, K. Comparison between nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic hepatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v.82, n.7, p.650-4, 1987.

JAMES, O.; DAY, C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. **Lancet** , v.353, p.1634-6, 1999.

KESHGEGIAN, A.A. Hypoalbuminemia associated with diffuse hypergammaglobulinemia in chronic diseases: lack of diagnostic specificity. **Am. J. Clin. Pathol.** v.81, p.477-81, 1984.

KLAR, A.; LIVNI, N.; GROSS-KIESELSTEIN, E.; NAVON, P.; SHAHIN, A.; BRANSKI, D. Ultrastructural abnormalities of the liver in total lipodystrophy. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 111, p.197-9, 1970.

KIMURA, H.; KAKO, M.; YO, K.; ODA, T. Alcoholic hyalins (Mallory bodies) in a case of Weber-Christian disease: electron microscopic observations of liver involvement. **Gastroenterology**, v.78, n.4, p.807-12, 1980.

KNODELL, R.G.; ISHAK, K.G.; BLACK, W.C.; CHEN, T.S.; CRAIG, R.; KAPLOWITZ, N.; KIERNAN, T.W.; WOLLMAN, J. Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. **Hepatology**, v.1, n.5, p.431-5, 1981.



KUCZMARSKI, R.J.; CARROLL, M.D.; FLEGAL, K.M.; TROIANO, R.P.  
Varying body mass index cutoff points to describe overweight prevalence among U.S. adults: NHANES III (1988 to 1994). **Obes. Res.** v.5, n.6, p.542-8, 1997.

KUGELMAS, M.; VIVIAN, B.; GLASS, J.; ANTLE, A.; TALWAKAR, R.  
Cytokine profiles in NASH: effects of diet, exercise, and vitamin E. [Abstract 26 A5]. Apresentado no DDW<sup>®</sup> Scientific Sessions, Orlando, Florida, 1999.

LAURIN, J.; LINDOR, K.D.; CRIPPIN, J.S.; GOSSARD, A.; GORES, G.J.; LUDWIG, J.; RAKELA, J.; MCGILL, D.B. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. **Hepatology**, v.23, p.1464-7, 1996.

LAWRENCE, R.D. Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia and other metabolic disturbances. **Lancet**, v.i, p.724-41, 1946.

LEE, R.G. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. **Hum. Pathol.** v.20, p.594-8, 1989.

LEE, R.G. Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler. **Hepatology**, v.21, n.6, p.1742-3, 1995.

LEE, R.G. Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis Pathology. In: **Clinical and Pathological correlations in liver disease: approaching the next**

**millenium**. Post Graduate Course - American Association for the study of Liver Diseases, EUA, 1998. p. 274-83. [Apostila]

LEEVY, C.M. Fatty liver: A study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and review of the literature. **Medicine**, v. 41, p.249-76, 1962.

LETTÉRON, P.; FROMENTY, B.; TERRIS, B.; DEGOTT, C.; PESSAYRE, D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to *in vivo* lipid peroxidation in mice. **J. Hepatol.**, v.24, p.200-8, 1996.

LEWIS, J.H.; RANARD, R.C.; CARUSO, A.; JACKSON, L.K.; MULLICK, F.; ISHAK, K.G.; SEEFF, L.B.; ZIMMERMAN, H.J. Amiodarone hepatotoxicity: prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. **Hepatology**, v.9, n.5, p.679-85, 1989.

LONARDO, A.; BELLINI, M.; TONDELLI, E.; FRAZZONI, M.; GRISENDI, A.; PULVIRENTI, M.; DELLA CASA, G. Nonalcoholic steatohepatitis and the "bright liver syndrome": should a recently expanded clinical entity be further expanded? [letter] **Am. J. Gastroenterol.**, v.90, n.11, p.2072-4, 1995.

LUDWIG, J.; BATTS, K.P.; MOYER, T.P.; BALDUS, W.P.; FAIRBANKS, V.F. Liver biopsy diagnosis of homozygous hemochromatosis: a diagnostic algoritm. **Mayo Clin. Proc.**, v.68, p.263-7, 1993.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T.R.; MCGILL, D.B.; OTT, B.J. Nonalcoholic Steatohepatitis. Mayo Clinic Experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin. Proc.**, v.55, p.434-8, 1980.

LUMENG, L.; CRABB, D.W. Genetic aspects and risk factors in alcoholism and alcoholic liver disease. **Gastroenterology**, v.107, p.572-8, 1994.

MANNINEN, V.; ELO, O.; FRICK, M.H.; HAAPA, K.; HEINONEN, O.P.; HEISANMI, P.; HELO, P.; HUTTUNEN, J.K.; KAITANIEMI, P.; KOSHINEN, P.; MÄEPÄÄ, H.; MÄLKONEN, M.; MÄNTTÄRI, M.; NOROLA, S.; PASTERNAK, A.; PIKKARAINEN, J.; ROSNO, M.; SJÖBLOM, T.; NIKKILÄ, E.A. Lipid alterations and dieline in the incidence of coronary heart diseases in the Helsinki Heart Study. **J.A.M.A.**, v.260, p.641-51, 1988.

MARCEAU, P.; BIRON, S.; HOULD, F.S.; MARCEAU, S., SIMARD, S.; THUNG, S.N.; KRAL, J.G. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, n.5, p.1513-7, 1999.

MATTEONI, C.A.; YOUNOSSI, Z.M.; GRAMLICH, T.; BOPARAI, N.; LIU, Y.C.; MCCULLOUGH, A.J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v.116, p.1413-1419, 1999.

MENDLER, M.; TURLIN, B.; MOIRAND, R.; JOUANOLLE, A.; SAPEY, T.; GUYADER, D.; LE GALL, J.; BRISSOT, P.; DAVID, V.; DEUGNIER, Y. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. **Gastroenterology**, v.117, p.1155-63, 1999.

MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; POINTON, J.J.; SHEARMAN, J.D.; ROBSON, K.J. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. **J. Med. Genet.**, v.34, p.275-8, 1997.

MCLAREN, C.E.; MCLACHLAN, G.J.; HALLIDAY, J.W.; WEBB, S.I.; LEGGET, B.A.; JAZWINSKA, E.C.; CRAWFORD, H.G.; GORDEUK, V.R.; MCLAREN, G.D.; POWELL, L.W. Distribution of transferrin saturation in an Australian population: relevance to the early diagnosis of hemochromatosis. **Gastroenterology**, v.114, p.543-9, 1998.

MONTEIRO, C.A. Epidemiologia da Obesidade. In: HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLICY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo, Lemos Editorial, 1998. p. 15-30.

MURA, C.; RAGUENES, O. FEREC, C. *HFE* mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. **Blood**, v.93, n.8, p.2502-5, 1999.

NAGORE, N.; SCHEUER, P.J. The pathology of diabetic hepatitis. **Journal of Pathology**, v.156, p.155-60, 1988.

NAZIM, M., STAMP, G., HODGSON, H.J.F. Nonalcoholic steatohepatitis associated with small intestinal diverticulosis and bacterial overgrowth.

**Hepatogastroenterology**, v.36, n.5, p.349-51, 1989.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A.; ROLL, F.J. Chemotactic activity for human PMN generated during ethanol metabolism by rat hepatocytes: role of glutathione and glutathione peroxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.167, p1170-6, 1990.

PARTIN, J.S.; PARTIN, J.C.; SCHUBERT, W.K.; MACADAMS, J. Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: evolution of micronodular cirrhosis.

**Gastroenterology**, v.67, p.107-18, 1974.

PEREIRA, A.C.; MOTA, G.F.A.; KRIEGER, J.E. Haemochromatosis gene variants population structure in three different ethnic populations: effects of admixture for screening and diagnosis. [em publicação]. 2000.

PESSAYRE, D.; BICHARA, M.; DEGOTT, C.; POTET, F.; BENHAMOU, J.P.; FELDMANN, G. Perhexilene-maleate induced cirrhosis.

**Gastroenterology**, v.76, p.170-7, 1979.

PEURA, D.A.; STROMEYER, F.W.; JOHNSON, L.F. Liver injury with alcoholic hyaline after intestinal resection. **Gastroenterology**, v. 79, p. 28-30, 1980.

PIETRANGELO, A. Review: Hemochromatosis 1998: is one gene enough?

**J. Hepatol.**, v.29, p.502-9, 1998.

PINTO, H.C.; BAPTISTA, A.; CAMILO, M.E.; VALENTE, A.; SARAGOCA, A.;

DE MOURA, M.C. Nonalcoholic steatohepatitis: clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, p.172-9, 1996.

PIPERNO, A.; SAMPIETRO, M.; PIETRANGELO, A.; AROSIO, C.; LUPICA,

L.; MONTOSI, G.; VERGANI, A.; FRAQUELLI, M.; GIRELLI, D. PASQUERO, P. ROETTO, A.; GASPARINI, P. GARGION, S.; CONTE, D.; CAMASCHELLA, C. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. **Gastroenterology**, v.114, p.996-1002, 1998.

POWELL, E.E.; COOKSLEY, W.G.E.; HANSON, R.; SEARLE, J.;

HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. **Hepatology**, v.11, p.74-80, 1990.

POWELL, E.E.; SEARLE, J.; MORTIMER, R. Steatohepatitis associated with

lim lipodystrophy. **Gastroenterology**, v. 97, p.1022-4, 1989.

POWELL, L.W.; KERR, J.F. The pathology of the liver in hemochromatosis.

**Pathobiol. Annu.** v.5, p.317-37, 1975.

PRATT, D.S.; KNOX, T.A.; EFBAN, J. Tamoxifen-induced steatohepatitis.

**Ann. Intern. Med.**, v.123, p.236, 1995.

PROPST, A.; PROPST, T.; JUDMAIER, G.; VOGEL, W. Prognosis in nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, v.108, n.5, p.1607, 1995.

REDLICH, C.A.; CULLEN, M.R. Nonalcoholic steatohepatitis. [letter] **Ann. Intern. Med.**, v.127, n.5, p.410, 1997.

REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Care**, v. 20, p. 1183-1197, 1997.

SALDANHA, P.H. Mistura de raças – mistura de genes. **Ciência Hoje**, v.50, p.48-54, 1989.

SCHIFF, E.R.; SCHIFF, L. Needle biopsy of the liver. In: SCHIFF, L. **Diseases of the liver**. 7 ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1997. p. 216-25.

SEKI, K.; MINAMI, Y.; NISHIKAWA, M., KAWATA, S.; MIYOSHI, S.; IMAI, Y.; TARUI, S. 'Nonalcoholic steatohepatitis' induced by massive doses of synthetic estrogen. **Gastroenterol. Jpn.**, v.18, p.197-203, 1983.

SHAM, R.L.; OU, C.Y.; CAPPUCCIO, J.; BRAGGINS, C.; DUNNIGAN, K.; PHATAK, P.D. Correlation between genotype and phenotype in hereditary

hemochromatosis: analysis of 61 cases. **Blood Cells Mol. Dis.**, v.23, n. 16, p.314-20, 1997.

SHELDON, J.H. **Haemochromatosis**. London, Oxford University, 1935.

SHETH, S.G.; GORDON, F.D.; CHOPRA, S. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. **Ann. Intern. Med.**, v.126, p.137-45, 1997.

SHETH, S.G.; FLAMM, S.L.; GORDON, F.D.; CHOPRA, S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am. J. Gastroenterol.** v.93, p.44-8, 1998.

SORBI, D.; BOYNTON, J.; LINDOR, K.D. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. **Am. J. Gastroenterol.** v.94, n.4, p.1018-22, 1999.

SORENSEN, T.I.; ORHOLM, M.; BENTSEN, K.D.; HOYBYE, G.; EGHOJE, K.; CHRISTOFFERSEN, P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. **Lancet**, v.2, n.8397, p.241-4, 1984.

TELI, M.R., JAMES, O.F.W., BURT, A.D.; BENNETT, M.K.; DAY, C.P. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. **Hepatology**, v.22, p.1714-9, 1995.



TOREZAN FILHO, M.A. **Elevação de alanina aminotransferase em doadores de sangue: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e histopatológico.** São Paulo, 1999. 145 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

TREVISANI, F.; COLANTONI, A.; CARACENI, P.; VAN THIEL, D.H. The use of donor fatty liver for liver transplantation: a challenge or a quagmire? **J. Hepatol.**, v.24, p.114-121, 1996.

TROUSSEAU, A. Glycosurie, diabète, sucré. In: **Clinique Médicale del'Hotel-Dieu de Paris.** v.2. 2. ed. Paris, Balliere, 1865.

TSIMIHODIMOS, V.; BAIRAKTARI, E.; TZALLAS, C.; MILTIADUS, G.; LIBEROPOULOS, E.; ELISAF, M. The incidence of thyroid function abnormalities in patients attending an outpatient lipid clinic. **Thyroid**, v.9, n.4, p.365-8, 1999.

UENO, T.; SUGAWARA, H.; SUJAKU, K.; HASHIMOTO, O.; TSUJI, R.; TAMAKI, S.; TORIMURA, T.; INUZUKA, S.; SATA, M.; TANIKAWA, K. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. **J. Hepatol.** n.27; p.103-7; 1997.

VAN NESS, M.; DIEHL, A.M. Is liver biopsy useful in the evaluation of patients with chronically elevated liver enzymes? **Ann. Int. Med.** v.111, p.473-8, 1989.

VAN THIEL, D.H. Diabetes mellitus and hepatobiliary disease. **Curr. Concepts Gastroenterol.**, 1986;4:4-13.

VAZQUEZ, C.M.; MOLINA, M.T.; ILUNDAIN, A. Distal small bowel resection increases mucosal permeability in the large intestine. **Digestion**, v.40, n.3, p.168-72, 1988.

VON RECKLINGHAUSEN, V.D. Über Hämochromatose. **Tagebl. Versamml. Natur. Ärzte** (Heidelberg), v.62, p.324, 1889.

WALLACE, D.F.; DOOLEY, J.S.; WALKER, A.P. A novel mutation of *HFE* explains the classical phenotype of genetic hemochromatosis in a C282Y heterozygote. **Gastroenterology**, v.116, n.6, p.1409-12, 1999.

WANLESS, I.R.; LENTZ, J.S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology**, v. 12, p.1106-10, 1990.

YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; LANE, M.D.; CLEMENS, M.; DIEHL, A.M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implication for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.94, p.2557-62, 1997.

YOKOMIZO, I.K. **Determinação de Haplótipos em pacientes portadores de anemia falciforme.** São Paulo, 1998. 95 p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

YOUNG, S.P.; AISEN, P. The liver and iron. In: ARIAS, I.M.; BOYER, L.; FAUSTO, N.L JAKOBY, W.B.; SCHACHTER, D.A.; SHAFRITZ, D.A., ed. **The liver: Biology and Pathobiology**. 3.ed. New York, Raven Press, Ltd., 1994. p.597-611.

YOUNOSSI, Z.M.; GRAMLICH, T.; BACON, B.R.; MATTEONI, C.A.; BOPARAI, N.; O'NEILL,R.O.; MCCULLOUGH, A.J. Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v.30, n.4, p.847-50, 1999.

YUNIS, C.; KROB, H.A. Status of health and prevalence of hypertension in Brazil. **Ethn. Dis.** v.8, n.3, p.406-12, 1998.

ZHOU, S.L.; GORDON, R.E.; BRADBURY, M.; STUMP, D.; KIANG, C.L.; BERK, P.D. Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells. **Hepatology**, v.27, n.4, p. 1064-74, 1998.