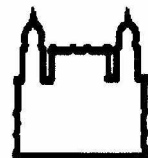


UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS NÃO
ÓRGÃO ESPECÍFICOS EM POPULAÇÃO RURAL DO
NORDESTE BRASILEIRO (CAVUNGE-BA)**

LILIANE MONTEIRO CUNHA

Salvador - Bahia - Brasil

2009



004094



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS NÃO
ÓRGÃO ESPECÍFICOS EM POPULAÇÃO RURAL DO
NORDESTE BRASILEIRO (CAVUNGE-BA)**

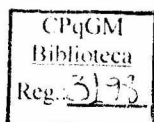
LILIANE MONTEIRO CUNHA

**Orientador: Dr. PAULO LISBOA BITTENCOURT
Co-orientação: Dr. ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE**

Dissertação Apresentada para Obtenção
do Grau de Mestre em Patologia (Área
de Concentração: Patologia Experimental)

Salvador - Bahia - Brasil

2009



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Cunha, Liliane Monteiro

C972e Estudo de prevalência de auto-anticorpos não órgão específicos em população rural do nordeste brasileiro (Cavunge-Ba). [manuscrito] / Liliane Monteiro Cunha. - 2009.
104 f. : il. : 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lisboa Bittencourt, Laboratório de Patologia.

1. Auto-anticorpos. 2. Hepatite auto-imune. 3. Cirrose biliar primária. 4. Hepatites virais. 5. População normal I. Título.

CDU 616.36-002(813.8)

PHL

UFV 3145

DD 41: 70

016.36-002(813.8)

C972e

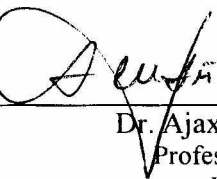
2009

Estudo de prevalência de auto-anticorpos não órgão específicos em população rural do nordeste brasileiro (Cavunge-Ba)".

LILIANE MONTEIRO CUNHA

FOLHA DE APROVAÇÃO

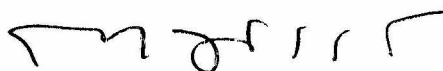
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Ajax Mercês Atta
Professor Titular
UFBA



Dr. Manoel Barral- Netto
Pesquisador Titular
FIOCRUZ-UFBA



Dr. Paulo Lisboa Bittencourt
Médico
Real Sociedade Portuguesa de Beneficência -
Brasil

“A verdadeira função do homem é viver, não existir. Eu não gastarei meus dias tentando prolongá-los. Eu usarei meu tempo”.

(Jack London)

Dedicatória

Ao meu esposo Pedro Hugo, por toda compreensão e amor; Aos meus pais Castilho e Célia que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida; Aos meus irmãos Mônica e Edinho por todo o carinho e amizade; Ao meu sobrinho Assaf Jorge por iluminar meus dias.

AGRADECIMENTOS

- A população de Cavunge pela confiança e generosidade.
- Ao meu orientador Dr. Paulo Lisboa Bittencourt, pessoa que tenho profunda admiração como, pesquisador, médico e ser humano, pelos ensinamentos, as oportunidades que me foram dadas, enfim por tudo que foi e é essencial para minha formação profissional e científica.
- Ao Dr. Zilton Andrade, pessoa que me acolheu no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e me deu a oportunidade de crescer não só como profissional, mas como pessoa. Muito obrigada pela ajuda indispensável em minha dissertação e pelos ensinamentos ao longo de todos esses anos.
- Ao laboratório LPC pela realização das técnicas indispensáveis para realização deste trabalho, em especial a Dra. Agna, Dra Jussara, Gisele e Vanessa.
- Aos funcionários do setor de virologia do LACEN pelo apoio na realização da sorologia viral, em especial a Dra. Maria Alice Zarife, Felicidade Pereira, e Neuza Silva Santos.
- Aos colegas do Biotério, em especial ao meu chefe Vitor Maffili pelo apoio e compreensão.
- A todos os meus amigos do LAPEX e LACEI, em especial, Ana Cristina, Antônio Carlos, Márcio Lázaro, Renata Portella, Karina Sobral, Bárbara Cristina e Mirela Castelo Branco, pela amizade, incentivo, conselhos e por tudo que fizeram e fazem por mim nesta trajetória.

- A Dra. Delvone Almeida pela ajuda indispensável na avaliação clínica das pessoas envolvidas no estudo.
- Ao laboratório de Investigação Médica do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Clarice Abrantes-Lemos pela dedicação, carinho e atenção.
- Ao CNPq e ao PRONEX pelo apoio financeiro.
- A CAPES pela bolsa de mestrado.
- A Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz-CPqGM) por toda infra-estrutura fundamental para o desenvolvimento dessa dissertação.
- Ao pessoal da Biblioteca Eurídice Santana, em especial Ana Maria Fiscina pela correção das referências bibliográficas.
- A Pedro Hugo Oliveira Curvelo de Almeida pelo amor e por toda paciência e compreensão nos momentos em que estive ausente.
- Aos meus pais José Castilho T. Cunha e Célia Maria M. Cunha por todo sentido de vida, amor, responsabilidade, paciência, compreensão enfim por serem responsáveis pela pessoa que hoje sou.
- Aos meus irmãos Mônica e Edinho pelas alegrias, cumplicidade, amizade e amor.

INDÍCE

1-INTRODUÇÃO	15
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Auto-anticorpos.....	17
2.2 Auto-anticorpos não órgão-específicos.....	20
2.3 Auto-anticorpos nas doenças auto-imunes do fígado.....	24
2.4 Auto-anticorpos nas hepatites virais.....	31
2.5 Auto-anticorpos em indivíduos normais.....	33
3-JUSTIFICATIVA	35
4-HIPÓTESE	36
5-OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6- CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	38
6.1 Desenho do Estudo.....	38
6.2 População de Referência.....	38
6.3 População do Estudo.....	38
6.4 Caracterização da Área e da População de Referência.....	38
6.5 Fluxograma do Estudo.....	41
6.6 Coleta e Armazenamento das Amostras.....	42
6.7 Identificação dos Auto-Anticorpos	42
6.7.1 Identificação dos SMA, anti-LKM1, anti-LC1 e AMA.....	43
6.7.2 Identificação do ANA.....	45
6.7.3 Identificação do anticorpo anti-microfilamento.....	46

6.7.4 Identificação do Anticorpo Anti-M2 e anti-LKM1 e anti-LC1 por Immunoblotting.....	47
6.8 Avaliação Clínica e Laboratorial dos Indivíduos com Auto-Anticorpos	50
6.9 Avaliação de Marcadores Sorológicos de Infecção Viral Progressiva ou Atual.....	51
6.10 Análise Estatística.....	52
6.11 Aspectos Éticos.....	53
7.RESULTADOS.....	54
7.1 Caracterização da população estudada.....	54
7.2 Pesquisa de auto-anticorpos.....	55
7.3 Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas.....	57
7.4 Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou progressiva por vírus hepatotrópicos.....	59
7.5 Correlacionar a ocorrência de auto-anticorpos com doença auto-imune.....	62
8. DISCUSSÃO.....	67
9. CONCLUSÃO.....	81
10. PERSPECTIVAS.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXO I.....	98
ANEXO II.....	101
ANEXO III.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados Demográficos da População Estudada do Município de Cavunge.....	54
Tabela 2: Correlação entre padrão de reatividade e titulação dos SMA e ANA.....	56
Tabela3: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas.....	58
Tabela 4: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas de acordo com o título.....	59
Tabela 5: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou pregressa por vírus hepatotrópicos.....	61
Tabela 6: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou pregressa por vírus hepatotrópicos de acordo com o título.....	62
Tabela 7: Características demográficas, laboratoriais e clínicas dos indivíduos com positividade para SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 em títulos $\geq 1:80$ e AMA em títulos $\geq 1:40$ na IFI.....	65
Tabela 8: Características demográficas, laboratoriais e clínicas dos indivíduos com positividade para SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 em títulos $\geq 1:80$ e AMA em títulos $\geq 1:40$ na IFI.....	66
Tabela 9: Frequência do SMA em indivíduos saudáveis por imunofluorescência indireta em cortes de roedores.....	77

Tabela 10: Freqüência de reatividade para ANA em crianças saudáveis.....	78
Tabela 11: Freqüência de reatividade para ANA em adultos saudáveis.....	79
Tabela 12: Freqüência do AMA em indivíduos saudáveis segundo alguns dados da literatura.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-SLA	ANTICORPO ANTIANTÍGENO HEPÁTICO SOLUVEL
anti-LC1	ANTICORPO ANTICITOSOL HEPÁTICO TIPO 1
anti-LP	ANTICORPO ANTIFIGADO E PÂNCREAS
anti-LKM1	ANTICORPO ANTIMICROSSOMA DE FIGADA E RIM
SMA	ANTICORPO ANTIMUSCULO LISO
ANA	ANTICORPO ANTINUCLEO
AAMF	ANTICORPO ANTI-MICROFILAMENTO
AgHBc	ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE CENTRAL
AgHBs	ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DO VÍRUS B
ANTI-VHA	ANTICORPO CONTRA O VIRUS DA HEPATITE A
ANTI-VHB	ANTICORPO CONTRA O VIRUS DA HEPATITE B
ANTI-VHC	ANTICORPO CONTRA O VIRUS DA HEPATITE C
BCOADC	BRANCHED CHAIN OXOACID DEHYDROGENASE COMPLEX
CBP	CIRROSE BILIAR PRIMÁRIA
CEP	COLANGITE ESCLEROSANTE PRIMÁRIA
ELISA	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
FA	FOSFATASE ALCALINA
GGT	GAMA GLUTAMIL-TRANSFERASE
HAI	HEPATITE AUTO-IMUNE
IB	IMMUNOBLOTTING

IFI	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA
LSP	PROTEINA ESPECIFICA HEPATICA
OGDC	OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE COMPLEX
PAAC	PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES
P-ANCA	ANTICORPO ANTICITOPLASMA DE NEUTROFILO PERINUCLEAR
PDC	PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX
PT e F	PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES
RAGP	RECEPTOR DE ASIALOGLICOPROTEINA
AST	ASPARTATO AMINOTRANSFERASE
ALT	ALANINA AMINOTRASFERASE
VHA	VÍRUS DA HEPATITE A
VHB	VÍRUS DA HEPATITE B
VHC	VÍRUS DA HEPATITE C

RESUMO

ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS NÃO ÓRGÃO ESPECÍFICOS EM POPULAÇÃO RURAL DO NORDESTE BRASILEIRO (CAVUNGE-BA). **LILIANE MONTEIRO CUNHA**. Os auto-anticorpos hepáticos (AAH), incluindo os anticorpos antinúcleo (ANA), antimúsculo liso (SMA), antimicrosoma de fígado e rim do tipo 1 (anti-LKM1), anticitosol hepático do tipo 1 (anti-LC1) e antimitocôndria (AMA), podem ser encontrados em 1% a 43% dos indivíduos saudáveis, sendo considerados auto-anticorpos naturais. Por outro lado, são também considerados marcadores de enfermidades auto-imunes, particularmente hepatite auto-imune (HAI) e cirrose biliar primária (CBP), duas doenças auto-imunes do fígado de prevalência ainda desconhecida na população brasileira. Com o intuito de avaliar a frequência de AAH na população normal e sua correlação com estado de doença e de investigar a prevalência de HAI e CBP no Brasil, foram coletadas amostras de soro de 725 indivíduos, aleatoriamente selecionados, residentes no povoado de Cavunge para realização de AAH por imunofluorescência indireta (IFI), empregando cortes de roedores, fibroblastos e células Hep-2. Os resultados foram comparados com dados demográficos e marcadores sorológicos de infecção por vírus A, B e C. Positividade para AAH foi considerada na presença de titulação igual ou superior a 1:40, sendo considerada clinicamente relevante titulação igual ou superior a 1:80. Cento e um indivíduos (14%) apresentaram reatividade para AAH, a maioria com títulos de 1:40, sendo observada positividade para SMA, ANA e AMA em respectivamente 10%, 4% e 0,1% dos indivíduos. Não foi encontrada reatividade para anti-LKM1 e anti-LC1. Os principais padrões de IFI para SMA e ANA foram, respectivamente, vaso e glomérulo e nuclear pontilhado grosso. Apenas um indivíduo com SMA exibiu reatividade para anti-microfilamento em baixo título, não sendo observada reatividade para anti-M2 no único portador de AMA. Indivíduos com AAH positivos apresentaram idade significativamente maior e maior preponderância do sexo feminino, quando comparados àqueles sem reatividade para AAH. Não foi observada correlação entre infecção pregressa ou ativa por vírus hepatotrópicos e AAH. Nenhum paciente com HAI ou CBP foi identificado empregando o rastreamento de AAH como estratégia. Corroborando com dados da literatura, os resultados do presente estudo indicam que AAH ocorrem em baixos títulos na população normal, preponderantemente em mulheres e em indivíduos com idade mais avançada e não se correlacionam com estado de doença. Diante da raridade dessas enfermidades na população brasileira, o emprego isolado destes auto-anticorpos como marcadores de doença hepática auto-imune, em nosso meio, deve portanto ser fortemente desaconselhado.

Palavras-chave: 1. Auto-anticorpos; 2. Hepatite auto-imune; 3. Cirrose biliar primária; 4. Hepatites virais; 5. População normal.

ABSTRACT

STUDY OF PREVALENCE NO ORGAN SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN RURAL POPULATION OF NORTHEASTERN BRAZIL. **LILIANE MONTEIRO CUNHA.** Antinuclear (ANA), anti-smooth muscle (SMA), anti-mitochondrial (AMA), anti-liver kidney microsome type 1 (anti-LKM1) and anti-liver citosol type 1 (anti-LC1) antibodies are reported to occur in approximately 1% to 43% of healthy subjects, usually in low titers. When in higher titers, they are considered, as well, as serological markers of autoimmune diseases of the liver, such as autoimmune hepatitis (AIH) and primary biliary cirrhosis (PBC). Even though both diseases are said to be rare in Brazil, their prevalence is currently unknown in Brazilians. The aims of the present study were to determine the frequency of the aforementioned auto-antibodies (AA) in healthy subjects from a rural Brazilian community, as well as to correlate its presence with viral and autoimmune diseases, particularly AIH and PBC. Seven hundred twenty-five subjects from Cavunge, Brazil were submitted to laboratory evaluation in order to search for the presence of ANA, SMA, AMA, anti-LKM1 and anti-LC1 by indirect immunofluorescence (IIF). Titers equal or above 1:40 or equal or above 1:80 were considered positive or clinically relevant, respectively. All subjects with AA in clinically relevant titers were subsequently evaluated for the presence of autoimmune or infectious disorders. Comparisons of results were undertaken with demographic parameters and serology for hepatitis A, B and C. One hundred and one (14%) subjects had AA, particularly SMA (10%), ANA (4%) and AMA (0,1%). Most had titers equal to 1:40. None had reactivity for anti-LKM1 or anti-LC1. One subject with SMA exhibited reactivity to anti-microfilament antibody. On the contrary, no reactivity for anti-M2 antibody was disclosed in the AMA-positive subject. Subjects with AA were significantly more frequently females and had higher age, when compared to their counterparts without AA. No correlation between past or present serological evidence of hepatitis A, B or C and occurrence of AA was disclosed. Further clinical and laboratory evaluation failed to disclose any case of AIH or PBC. The only subject with AMA by IIF had no cholestasis. In conclusion, AA can occur in a subset of healthy subjects, more frequently in females and in the elderly, and are not associated with viral or autoimmune diseases. Caution should be taken when using AA solely as markers of autoimmunity, due to its frequency in the general population and the rarity of autoimmune liver diseases at least in Brazil.

Key words: 1. Autoantibodies; 2. Healthy subjects; 3. Autoimmune hepatitis; 4. Viral hepatitis; 5. primary biliary cirrhosis.

1. INTRODUÇÃO

Os auto-anticorpos: anticorpo antinúcleo (ANA), antimúsculo liso (SMA), antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM1) e antimitocôndria (AMA) são importantes marcadores das doenças auto-imunes do fígado: hepatite auto-imune (HAI), cirrose biliar primária (CBP) e colangite esclerosante primária (CEP). Contudo estes auto-anticorpos podem também ser encontrados em baixos títulos em cerca de 1%-43% dos indivíduos saudáveis. Sua prevalência na população brasileira é pouco conhecida. Com exceção do AMA, os auto-anticorpos são freqüentemente encontrados em portadores de hepatites virais. No entanto, são empregados como marcadores da HAI, particularmente quando encontrados em altos títulos, iguais ou superiores a de 1:80 e com isotipo IgG. Por outro lado, o AMA, devido à sua especificidade, vem sendo usado como ferramenta para rastreamento populacional de CBP.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a prevalência de auto-anticorpos em uma população rural do Nordeste Brasileiro, correlacionando sua positividade com variáveis demográficas, infecção atual ou pregressa por vírus hepatotrópicos e doença auto-imune.

Pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada a pesquisa de ANA, SMA, anti-LKM1, anti-LC1 e AMA, empregando-se como substrato cortes de fígado, rim, estômago de rato e células HEp-2 com titulação a partir de 1:40. Dados epidemiológicos sobre a prevalência dos auto-anticorpos não orgão específico serão importantes para estabelecer a freqüência destes auto-anticorpos na população de Cavunge, Bahia e sua correlação com estado de

doença, assim como também sua especificidade como marcador sorológico de doença hepática auto-imune.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Auto-anticorpos

Os auto-anticorpos são imunoglobulinas, não necessariamente associadas ao desenvolvimento de doença, que reagem contra epítomos antigênicos de proteínas do hospedeiro (TOMER & SHOENFELD, 1988; SENEAL *et al.*, 1993). Auto-anticorpos podem ser encontrados em cerca de 1% a 43% de indivíduos saudáveis (HOOPER *et al.*, 1972; ANDERSEN, 1977; SMIKLE & JAMES 1994; NJEMINI *et al.*, 2002; TEUBNER *et al.*, 2002; ALI *et al.*, 2003) sendo denominados auto-anticorpos naturais, não estando relacionados ao estado de doença, nem a maior propensão de desenvolver doença (LACROIX-DESMAZES *et al.*, 1998). Sua produção é uma resposta da célula progenitora, denominada linfócito B-1, que é geneticamente codificada e modulada através de linfócitos T de atividade supressora (TOMER & SHOENFELD, 1988). Segundo Tomer & Shoenfeld (1988), animais timectomizados induzem sua produção. Em humanos a atrofia do timo com o avanço da idade contribui pra o aumento desses anticorpos naturais (CURRIE, 1992).

O linfócito B-1 é um subtipo de linfócito, chamado de célula B-1, diferente da maioria dos linfócitos B, desenvolvendo-se de maneira única (WARDEMANN *et al.*, 2003; ABBAS *et al.*, 2007). As células B-1 se desenvolvem mais cedo na ontogenia do que as células B convencionais. Geralmente as células B-1 expressam a molécula CD-5 (Ly-1) e se desenvolvem de células-tronco hematopoéticas no fígado fetal (MEFFRE *et al.*, 2003; WARDEMANN *et al.*, 2003; HARDY, 2006; ABBAS *et al.*, 2007).

Os anticorpos naturais produzidos por essas células geralmente não tem capacidade de fixação de complemento, possuem baixa afinidade de ligação com antígenos e múltipla reatividade (TERNYNCK & AVRAMEAS, 1986; CHAI *et al.*, 1994; COUTINHO *et al.*, 1995; DIAW *et al.*, 1997). São mais freqüentemente observados no sexo feminino, apresentam baixos títulos e isotipo de imunoglobulina M (IgM) (TOMER & SHOENFELD, 1988; SENEAL *et al.*, 1993; LACROIX-DESMAZES *et al.*, 1998; CZAJA, 1995). Acredita-se que se liguem a antígenos tissulares provenientes de morte celular por necrose ou apoptose ou à antígenos exógenos que apresentem reatividade cruzada com antígenos próprios. Estima-se que estes auto-anticorpos participem dos fenômenos de tolerância imunológica, pelo seu potencial de ligação com auto-antígenos, evitando a indução de clones de linfócitos auto-reativos (TOMER & SHOENFELD, 1988; SENEAL *et al.*, 1993; GRUPPI *et al.*, 1994; KAZATKCHINE, 1996; BOGDANOS *et al.*, 2008). Pierre Grabar (1975, 1983) sugeriu que tais auto-anticorpos poderiam estar atuando na manutenção da saúde, marcando as células e moléculas para posterior remoção. Dessa forma, assim como a auto-tolerância estabelecida cedo na vida os auto-anticorpos naturais que se desenvolvem mais tarde estariam mantendo a saúde ao longo da vida.

Por outro lado, uma serie de doenças auto-imunes se associam à presença de auto-anticorpos circulantes. Estes auto-anticorpos são considerados patogênicos, mesmo na ausência de sua implicação na etiopatogenia de doença (SENEAL *et al.*, 1993). Eles geralmente são produzidos por ativação antígeno-específica de clones de linfócitos B, estando presentes em altos títulos e apresentando isotipo de imunoglobulina G (IgG). Contrastando com os auto-

anticorpos naturais, eles caracterizam-se por apresentar atividade de fixação de complemento, alta afinidade de ligação antigênica e por inibirem a atividade *in vitro* dos seus respectivos auto-antígenos (SENECAL *et al*, 1993; CZAJA, 1995). A maioria dos auto-anticorpos associados às doenças auto-imunes não são reconhecidamente patogênicos e não têm especificidade para determinado órgão ou doença (CZAJA, 1995a). São denominados auto-anticorpos não órgão-específicos. A reatividade destes auto-anticorpos está dirigida contra o DNA nuclear e proteínas ubiquitárias nucleares e citoplasmáticas (FRITZLER & RATTNER, 1998; MANNS, 1991). Embora seu papel na gênese da doença seja controverso, sua mera presença indica presença de fenômenos de auto-imunidade ou de alterações imunorregulatórias associadas à expressão e/ou perpetuação de doença (LACROIX-DESMAZES *et al.*, 1998; ZACHOU, 2004). Muitos consideram a presença desses auto-anticorpos circulantes como epifenômeno, conseqüente à maior exposição de antígenos intracelulares, anatomicamente seqüestrados, ao sistema imune num *milieu* inflamatório (AVRAMEAS, 1991; CZAJA, 1995). Entretanto, sua ausência numa série de doenças inflamatórias e/ou infecciosas, sua relação estreita com determinadas enfermidades auto-imunes ou com certas formas de apresentação destas doenças, assim como também sua associação com determinados haplótipos HLA sugere que eles não são simples marcadores de destruição tissular e indicam a existência de papel relevante destes anticorpos no desencadeamento e no curso evolutivo das doenças auto-imunes (HOMBERG *et al*, 1987; CZAJA *et al.*, 1993b, c, 1995a; BITTENCOURT *et al.*, 1999).

Auto-anticorpos são também freqüentemente detectados em portadores de doenças infecciosas, particularmente nos portadores de hepatites virais. É importante ressaltar que nestes pacientes seu título é geralmente baixo e sua presença se correlaciona com a atividade da doença infecciosa (CZAJA *et al.*, 1992; CZAJA *et al.*, 1993; FRIED *et al.*, 1993; REDDY *et al.*, 1993; CLIFFORD *et al.*, 1995; BORTOLOTTI *et al.*, 1996; MARGARIGA, 2005). Por outro lado, podem também estar associados ao desenvolvimento de fenômenos de auto-imunidade associados às infecções virais (ABUAF *et al.*, 1993; GIOSTRA *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1997; CACOUB *et al.*, 2000; BARRETT *et al.*, 2001; RAMOS-CASALS *et al.*, 2005). Nestas circunstâncias geralmente apresentam-se em altos títulos e associam-se à ocorrência de infiltrado inflamatório no órgão-alvo, característico de doença auto-imune (WASHINGTON, 2007).

2.2 Auto-anticorpos não órgão-específicos

São auto-anticorpos circulantes encontrados em portadores de doenças auto-imunes do fígado, particularmente naqueles pacientes com hepatite auto-imune (HAI), cirrose biliar primária (CBP) e colangite esclerosante primária (CEP).

Os principais auto-anticorpos são os anticorpos antinúcleo (ANA), anti-músculo liso (SMA), anti-microssoma de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM1) e anti-mitocôndria (AMA). Estes auto-anticorpos são marcadores sorológicos empregados no diagnóstico da HAI e CBP. Contudo, outros anticorpos, considerados auxiliares por não serem testados rotineiramente, podem ser detectados no soro de pacientes com hepatopatias auto-imunes, incluindo o

anticorpo anticitosol hepático tipo1 (anti-LC1); o antiantígeno hepático solúvel (anti-SLA), também conhecido por anti-antígeno de fígado e pâncreas (LP); o anticitoplasma de neutrófilos perinuclear (p-ANCA); o anti-proteína específica hepática (anti-LSP) e o anti-receptor de asialoglicoproteína (AARAGP) (VERGANI *et al.*, 2004; BOGDANOS *et al.*, 2008).

O SMA foi inicialmente detectado em amostras de soros de pacientes com doenças hepáticas por Johnson e colaboradores, em 1965 (JOHNSON *et al.*, 1965). Eles verificaram anticorpos que se ligam ao músculo liso do estômago de rato. Em 1976, Bottazzo e colaboradores utilizando como substrato cortes de rim de rato, classificou o SMA em três padrões: 1) vaso (SMA-V ou V) com fluorescência localizada na parede dos vasos renais; 2) glomérulo (SMA-G ou VG) com fluorescência em glomérulos e vasos e 3) túbulo (SMA-T ou VGT) com fluorescência em células tubulares, glomérulos e vasos.

O SMA reconhece também estruturas do citoesqueleto como: 1) filamentos intermediários: vimectina e desmina (GABBIANI *et al.*, 1981; KURKI *et al.*, 1977; KURKI *et al.*, 1978); 2) microtúbulos: tubulina (MEAD *et al.*, 1980); 3) proteínas musculares contráteis: miosina e tropomiosina (TRENCHÉV *et al.*, 1974); 4) microfilamentos, previamente designados como filamentos de actina polimerizada, actina F ou actina filamentosa (GABBIANI *et al.*, 1973; TOH BH, 1979; CANÇADO *et al.*, 2001; VERGANI *et al.* 2004). Alguns autores verificaram que títulos do SMA $\geq 1: 320$ geralmente refletem a presença de anticorpos antiactina, atualmente conhecidos como anticorpos anti-microfilamentos (CANÇADO, 1989; KRAWITT, 1996; VERGANI *et al.* 2004).

Miescher & Fauconnet em 1954, foram os primeiros a observar anticorpos do soro com especificidade para antígenos nucleares. A reatividade do ANA é dirigida contra o DNA nuclear, histonas e outras ribonucleoproteínas (CZAJA *et al.*, 1994; CZAJA *et al.*, 1995c; CZAJA *et al.*, 1997a).

O primeiro grupo a usar a expressão anticorpo anti-microsoma de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM1) foi o grupo do laboratório de Deborah Doniach (RIZZETTO *et al.*, 1973; RIZZETTO *et al.*, 1974; SMITH *et al.*, 1974). O nome “microsoma” corresponde *in vitro* ao equivalente das partículas do retículo endoplasmático onde o antígeno é encontrado. A reatividade do anti-LKM1 é direcionada contra proteínas de 50, 56 e 66 kDa do retículo endoplasmático liso e rugoso (RIZZETTO *et al.*, 1973; ALVAREZ *et al.*, 1985; MANNS *et al.*, 1989; CORDONER-FRANCH *et al.*, 1989). A proteína de 50 kDa foi identificada como o citocromo CYP2D6 e o anti-LKM1 reconhece segmentos lineares desta proteína, particularmente um peptídeo de oito aminoácidos (MANNS *et al.*, 1991b; YAMAMOTO *et al.*, 1993).

Com relação ao AMA houve uma importante descoberta em 1967, onde Berg *et al* demonstraram que o soro de pacientes com CBP reagem *in vitro* contra antígenos sensíveis à tripsina da membrana mitocondrial, denominado antígeno M2. O alvo M2 foi localizado na superfície interna da membrana mitocondrial de todas as mitocôndrias testadas. Nos anos 80 os antígenos do alvo M2 foram identificados como componentes do complexo 2-oxoácido desidrogenase. O complexo enzimático reconhecido é formado por componentes da subunidade E2 do complexo da piruvato desidrogenase, pelo complexo alfacetoglutarato desidrogenase e pelo complexo alfacetoácido desidrogenase de

cadeia ramificada (YEAMAN, 1989; LEUNG *et al.*, 1997; BOGDANOS *et al.*, 2003).

O anti-LC1 reconhece uma proteína de 62 kDa recentemente identificada como formiminotransferase ciclodeaminase, que está presente no citosol de hepatócitos humanos (LAPIERRE *et al.*, 1999; MURATORI *et al.*, 2001).

A reatividade do anticorpo anti-antígeno hepático solúvel (anti-SLA) é dirigida contra uma proteína citosólica, recentemente clonada de 50 kDa e de 422 aminoácidos de função ainda desconhecida. A mesma proteína é também reconhecida por outro auto-anticorpo previamente chamado anti-LP (MANNIS *et al.*, 1987; STECHEMESSER *et al.*, 1993).

A proteína específica hepática marcada pelo anticorpo anti-LSP é formada por um complexo macromolecular de conteúdo lipoproteico apresentando antígenos hepatocitários (CANÇADO, 1995; CZAJA & HOMBURGER, 2001). Dentro do complexo LSP encontra-se o antígeno receptor de asialoglicoproteína (RAGP) denominado lectina hepática, um dos poucos auto-antígenos específicos do fígado, expresso na membrana hepatocelular (BOGDANOS *et al.*, 2008). Os marcadores anti-LSP e o anti-RAGP não foram incorporados aos exames de rotina pela falta de padronização (CZAJA & HOMBURGER, 2001).

O anticorpo p-ANCA reconhece componentes do envelope nuclear dos neutrófilos, formando um padrão perinuclear grosseiro (TERJUNG *et al.*, 1998; AMARAL *et al.*, 1999).

2.3 Auto-anticorpos e Doenças Auto-imunes do Fígado

Os auto-anticorpos SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 e o AMA são marcadores sorológicos, respectivamente da HAI e CBP.

A colangite esclerosante primária não apresenta marcador sorológico com boa especificidade para o diagnóstico da doença. Ela é uma doença crônica obliterativa que se caracteriza pela destruição progressiva de ductos biliares intra e extra-hepáticos e por sua associação com doença inflamatória intestinal. Essa doença aparece preferencialmente em homens (2:1) em uma ampla escala de idade (1-90 anos) e apresenta evidência bioquímica e clínica de colestase. Quase metade são assintomáticos até o diagnóstico (BROOME, 1996; WASHINGTON, 2007). Quando apresentam sinais, estes são de fadiga, prurido, febre e colangite (WASHINGTON, 2007). Aproximadamente 1/3 dos pacientes apresenta ANA e/ou SMA. Apesar da grande maioria (60%-92%) dos pacientes com CEP apresentarem positividade para o p-ANCA (SEIBOLD *et al.*, 1994; AMARAL *et al.*, 1999; VERGANI *et al.*, 2004), este auto-anticorpo é considerado de uso limitado no diagnóstico da doença pela sua baixa especificidade e por ser encontrado em outras doenças auto-imunes do fígado (CZAJA, 1995; VERGANI *et al.*, 2004; BOGDANOS *et al.*, 2008).

O padrão-ouro para o diagnóstico da CEP é a colangiografia endoscópica, transparietal ou por ressonância nuclear magnética. O tratamento definitivo é o transplante de fígado nos casos de doença avançada (Washington, 2007).

A HAI é uma doença inflamatória crônica do fígado, de etiologia desconhecida, que leva à destruição progressiva do parênquima hepático e, na

ausência de tratamento imunossupressor, evolui freqüentemente para cirrose (CANÇADO et al., 2003). Esta doença acomete, preferencialmente, o sexo feminino em relação ao sexo masculino, em uma proporção de aproximadamente 4:1 (WASHINGTON, 2007). Apresenta duas faixas etárias de maior incidência: de 10 a 25 e de 40 a 70 anos de idade (TODA et al., 1997; MCFARLANE, 2002). A HAI clássica acomete geralmente mulheres, apresentando alta concentração de aminotranferases, hipergamaglobulinemia, amenorréia, artralguas, auto-anticorpos circulantes e infiltrado inflamatório portal linfoplasmocitário, associado à necrose em saca-bocados e à formação de rosetas de hepatócitos. (CZAJA, 1995; CZAJA et al., 2001; MCFARLANE, 2002). A maioria dos pacientes com HAI responde satisfatoriamente à terapêutica imunossupressora com remissão clínica, laboratorial e histológica. Após a suspensão do tratamento, 70% daqueles que obtiveram resposta completa apresentam recidiva da doença, necessitando do uso prolongado e contínuo de imunossupressores (CZAJA, 1995a; KRAWITT, 1996).

A HAI é classificada em dois tipos bem definidos, de acordo com o perfil de auto-anticorpos (HOMBERG et al., 1987; MADDREY, 1987; KRAWITT, 1994). O tipo 1 (HAI-1) apresenta positividade para o ANA e/ou SMA, com especificidade para o anticorpo anti-microfilamento (GABBIANI et al., 1973; LIDMAN, et al., 1976; TOH, 1979; FUSCONI, 1990; VERGANI et al. 2004). O tipo 2 (HAI-2) caracteriza-se pela presença do anti-LKM1 e/ou anti-LC1 (HOMBERG et al., 1987; MARTINI et al., 1988). O anti-LC1 é considerado um segundo marcador, tornando o exame mais específico para o diagnóstico de HAI tipo 2 devido à

possibilidade de associação do anti-LKM1 com o vírus da Hepatite C (CANÇADO, 1995; KRAWITT, 1996).

A classificação da HAI é sustentada pela heterogeneidade clínica da doença. Os pacientes com HAI-2, quando comparados aos portadores de HAI-1, apresentam características peculiares no início da enfermidade, tais como: menor idade, maior frequência de hepatite fulminante, níveis mais elevados de bilirrubinas e de aminotransferases e mais reduzidos de gamaglobulinas (MAGGIORE *et al.*, 1986; HOMBERG *et al.*, 1987; GREGORIO *et al.*, 1997; BITTENCOURT, 1999a).

Autores alemães propuseram um terceiro tipo de HAI, definido de acordo com a presença dos anti-SLA e/ou LP (MANNS *et al.*, 1987; STECHEMESSER *et al.*, 1993; MANNS, 1992). No entanto, estes auto-anticorpos também são freqüentemente detectados em pacientes com características clínicas e sorológicas da HAI-1, de forma que não são ainda aceitos como marcadores específicos de outro tipo de HAI. Portanto, a doença continua a ser classificada em apenas dois tipos sorológicos distintos (MCFARLANE, 1998a, VERGANI *et al.*, 2004; BOGDANOS *et al.*, 2008).

O anti-LKM1 é o principal marcador da HAI-2. Este anticorpo, contudo, foi também descrito em um percentual variável de pacientes com o vírus da hepatite C (HCV) na França, Itália e Reino Unido (LUNEL *et al.*, 1992). Com base nestes achados foi proposta uma subclassificação da doença em HAI-2a (HAI-2 clássica) e HAI-2b (HAI-2 associada ao HCV) (LUNEL *et al.*, 1992). Comprovou-se, posteriormente, que o padrão de reatividade do anti-LKM1 é diferente na HAI-2 e na hepatite C. A reatividade deste auto-anticorpo nos portadores de HCV é

direcionada contra epítomos tridimensionais e descontínuos do citocromo P450 da subfamília IID6 (CYP2D6), diferentes dos epítomos lineares do CYP2D6 reconhecidos pelo anti-LKM1 na HAI-2 (MURATORI *et al.*, 1995). Além disto, observou-se que os pacientes com HAI-2a e HAI-2b apresentavam aspectos clínicos e laboratoriais distintos. Os indivíduos com HAI-2a exibiam formas clínicas de doença indistinguíveis da HAI, enquanto que a maioria dos pacientes portadores de HAI-2b apresentava características clínicas, laboratoriais e resposta terapêutica ao interferon gama semelhantes aos indivíduos com hepatite C (CZAJA, 1995a; CASSANI *et al.*, 1997). Desta forma, a HAI-2 foi caracterizada como um tipo sorológico específico da HAI e a infecção por HCV com anti-LKM1, como hepatite C associada à auto-anticorpos (CZAJA, 1995; MANNS, 1995b)

A classificação da HAI em dois tipos é corroborada pela heterogeneidade na susceptibilidade genética observada nos pacientes com HAI-1, quando comparados a aqueles com o tipo 2 da doença. Neste contexto, a predisposição genética a HAI tipos 1 e 2 no Brasil foi associada, respectivamente, aos antígenos HLA-DR13 e DR3 e ao antígeno HLA-DR7. A associação da HAI-1 com o HLA-DR13 e da HAI-2 com o HLA-DR7 foi mais acentuada, respectivamente, nos pacientes com positividade para o SMA e AMAFR1, não sendo encontrada associação de HLA com HAI-1 com marcador ANA (BITTENCOURT *et al.*, 1999b; GOLDBERG *et al.*, 2001).

Os pacientes com HAI-1 com SMA foram mais freqüentemente crianças quando comparados com aqueles com ANA. Estes dados sugerem que determinados auto-anticorpos possam caracterizar tipos particulares de HAI com idade de acometimento e associação com antígenos HLA peculiares. Por outro

lado, podem também indicar uma maior predisposição ao desenvolvimento de anticorpos, influenciada por determinados alelos de HLA. O achado de maior frequência de SMA e ANA em indivíduos com hepatite C com HLA-DR3 antes e após tratamento com interferon gama corrobora com esta última hipótese.

Os critérios empregados para o diagnóstico de hepatite auto-imune são baseados em um sistema de pontuação proposto pelo Grupo Internacional de Estudo da HAI (JOHNSON *et al.*, 1993; ALVAREZ *et al.*, 1999, VERGANI *et al.*, 2004). Esse sistema possui um grau elevado de sensibilidade para o diagnóstico de HAI, excluindo de forma eficaz pacientes com CEP e desordens biliares (Washington, 2007). A presença de auto-anticorpos em títulos iguais a 1:40; 1:80 e superiores a 1:80 conferem pontuação + 1, +2 e +3, respectivamente (Anexo Ia). Estes títulos foram empregados para evitar realização de diagnóstico de HAI em portadores de outras doenças crônicas do fígado tais como doença de Wilson, deficiência da alfa 1 antitripsina, CBP, CEP e hepatites virais (WASHINGTON, 2007). Por outro lado, os títulos empregados para pontuação de auto-anticorpos em casos pediátricos de HAI foram muito baixos, 1: 10 para o anti-LKM1 e 1: 20 para ANA e SMA (VERGANI *et al.*, 2004). Estes títulos foram adotados por causa da experiência do grupo do *Kings-College*, que descreve HAI em crianças com títulos baixos de auto-anticorpos, experiência esta não compartilhada por autores nacionais. Recentemente, os critérios para o diagnóstico de HAI foram simplificados, englobando apenas quatro variáveis clínicas e laboratoriais, podendo os auto-anticorpos a depender do título conferir pontuação +1 e +2 (HENNES *et al.*, 2008) (Anexo 1b).

A CBP é uma doença colestática crônica do fígado em que ocorre a destruição progressiva dos ductos biliares intra-hepáticos através de um processo inflamatório granulomatoso não supurativo. Acomete preponderantemente mulheres entre a 5ª e 6ª décadas de vida e que evolui lentamente para cirrose hepática e insuficiência hepatocelular (WASHINGTON, 2007). Cinquenta por cento a 60% dos pacientes são assintomáticos e quando identificados após os testes sorológicos, apresentam elevação da fosfatase alcalina. Os sintomas geralmente aparecem dentro de 2 a 4 anos, contudo alguns indivíduos apresentam-se assintomáticos por anos. Os principais sintomas são fadiga e prurido (PRINCE *et al.*, 2002). O principal marcador da doença é o AMA, observado em 90%-100% dos pacientes com CBP. A doença caracteriza-se histopatologicamente pelo achado de colangite crônica destrutiva não supurativa associada à presença de células epitelióides e/ou granulomas (WASHINGTON, 2007). Como mencionado anteriormente a reatividade do AMA na CBP é direcionada contra enzimas do complexo 2-oxoácido desidrogenase, presentes na membrana mitocondrial interna dos mamíferos (YEAMAN, 1986; VAN DE WATER *et al.*, 1989). Estes complexos de multienzimas são constituídos pelo complexo piruvato desidrogenase ou pyruvate dehydrogenase complex (PDC) (principal componente antigênico na CBP), pelo complexo alfacetoglutarato desidrogenase ou oxoglutarate dehydrogenase complex (OGDC) e pelo complexo alfacetoácido desidrogenase de cadeia ramificada ou branched chain oxoacid dehydrogenase complex (BCOADC). Estas enzimas atuam em etapas importantes do metabolismo. O complexo piruvato desidrogenase participa da descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA e da oxidação do 2-

oxobutirato (YEAMAN, 1986; VAN DE WATER *et al.*, 1989). O complexo alfacetoglutarato desidrogenase é uma enzima do ciclo de Krebs que descarboxila o alfacetoglutarato e o complexo alfacetoácido desidrogenase de cadeia ramificada está envolvido no catabolismo de diversos aminoácidos como os de cadeia ramificada (YEAMAN, 1986; VAN DE WATER *et al.*, 1989). Cada complexo é constituído por múltiplas cópias de três diferentes enzimas denominadas E1, E2 e E3. O epítipo mais freqüentemente reconhecido pelo AMA é o PDC-E2. A pesquisa do AMA pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo imunofluorescência indireta (IFI), Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) e Immunoblotting (IB). A IFI detecta reatividade contra todas as enzimas do complexo 2-oxoácido desidrogenase, mas não consegue estabelecer a identidade dos antígenos-alvo. O IB é capaz de reconhecer as seguintes especificidades associadas ao AMA: antiCPD-E2 (74 kD), antiproteína X (56 kD), antiCACADCR (52 kD), antiCACGD (48 kD), antiCPDE1 alfa e antiCPDE beta (36 kD) (MACKAY *et al.*, 2000).

A sensibilidade do AMA para o diagnóstico de CBP é variável a depender da técnica empregada. Em cerca de 10% dos pacientes a IFI é negativa, sendo o diagnóstico confirmado apenas pelo IB. Cerca de 30% a 70% dos pacientes com CBP apresentam ANA, sendo este anticorpo o único marcador sorológico encontrado em uma minoria de pacientes com CBP (SZOSTECKI *et al.*, 1997; COURVALIN & WORMAN, 1997; KAPLAN & GERSHWIN, 2005). Esta variante sorológica da doença é denominada colangite auto-imune por alguns autores. A alta especificidade do AMA para o diagnóstico de CBP vem sendo questionada. Muito embora sua presença esteja fortemente relacionada à CBP ou a propensão

para desenvolver a doença em longo prazo, este anticorpo vem sendo encontrado em indivíduos saudáveis, em portadores de vírus C e de hepatite auto-imune (CZAJA *et al.*, 1993a; METCALF *et al.*, 1996, FARIAS *et al.*, 2006).

Ao contrario do que ocorre com a HAI, os corticosteróides não são eficazes para o tratamento da CBP. O tratamento mais indicado é o uso do ácido ursodeoxicólico, contudo o transplante de fígado pode ser necessário para a doença em estado avançado (LEUSCHNER *et al.*, 2000; WASHINGTON, 2007).

2.4 Auto-anticorpos e Hepatites Virais.

A organização Mundial de Saúde estima que no mundo sejam cerca de 325 milhões de portadores crônicos do vírus da hepatite B (HBV) e 170 milhões da hepatite C (HCV). No Brasil estima-se que pelo menos 70% da população já tiveram contato com o vírus da hepatite A (HAV), 15% com o vírus da hepatite B e 1% com o vírus C (ZARIFE, 2002; Relatório do Grupo de Estudos da Sociedade Brasileira de Hepatologia, 2002; Ministério da Saúde, 2005). No trabalho recentemente realizado por Almeida e colaboradores (2006) foi possível verificar a prevalência do vírus da hepatite A (83.3%), B (2.6%) e C (0.4%) na população de Cavunge, Bahia.

O vírus da hepatite A é de transmissão fecal-oral, por contato com água ou alimentos contaminados. É uma doença auto-limitada e de caráter benigno. Menos de 1% dos casos pode evoluir para hepatite fulminante. Pessoas que já tiveram hepatite A apresentam imunidade para esse tipo de doença, mas permanecem susceptíveis às outras hepatites (Ministério da Saúde, 2005). A

hepatite B é transmitida por via sanguínea, sexual e vertical (materno-infantil). Aproximadamente 5% a 10% dos indivíduos adultos infectados evoluem para hepatite B crônica, quando adquirem a doença na idade adulta, sendo esta freqüência muito maior (30%-90%) naqueles que adquirem a infecção por transmissão vertical ou na infância. A transmissão para o HCV ocorre principalmente por via parenteral (usuários de drogas, transfusão de sangue, tatuagens, piercings, etc). A evolução para infecção crônica ocorre em 70 a 85% dos casos (HOOFNAGLE, 2002; SEEF, 2002).

A prevalência de auto-anticorpos nas hepatites virais é variável. Estudos em centros de referência demonstraram prevalência de 2% a 66%, sendo que a maioria dos auto-anticorpos detectados (ANA, SMA e AMAFR1) apresentava baixo título (CZAJA *et al.*, 1992; CZAJA *et al.*, 1993; FRIED *et al.*, 1993; REDDY *et al.*, 1993; CLIFFORD *et al.*, 1995; BORTOLOTTI *et al.*, 1996; MARGARIDA, 2005).

O SMA e o ANA podem ser encontrados em hepatites virais (HOLBOROW *et al.*, 1973; KANAKOUDI-TSAKALIDIS *et al.*, 1979; LIDMAN, 1976; CLIFFORD *et al.*, 1995; BORTOLOTTI *et al.*, 1996). O SMA encontrado em pacientes com infecção viral é principalmente reativo contra filamentos intermediários, em contraste com o SMA na HAI cuja reatividade está direcionada para microfilamentos (TOH, 1979; FUSCONI *et al.*, 1990).

Estudo recente com base populacional demonstrou auto-anticorpos circulantes em cerca de 20% dos portadores de vírus C e em 7% dos indivíduos com hepatite B residentes no norte da Itália (LENZI *et al.*, 1999). Os ANA e SMA foram os mais comumente observados. A freqüência de auto-anticorpos foi

significativamente aumentada nos portadores de vírus C quando comparados com indivíduos saudáveis do grupo-controle com anti-HCV e AgHBs negativos (LENZI *et al.*, 1999).

2.5 Auto-anticorpos em Indivíduos saudáveis.

Auto-anticorpos marcadores de doenças auto-imunes no fígado, particularmente ANA e SMA, foram detectados em até 31% dos indivíduos saudáveis de acordo com estudos realizados em voluntários e em doadores de sangue, a maioria da década de setenta antes do advento de ensaios diagnósticos para a hepatite C (HOOPER *et al.*, 1972, ANDERSEN, 1977; BULLOCK *et al.*, 1979; WHITEHOUSE & HOLBOROW, 1971; WASSERMANN *et al.*, 1975; MCMILLAN & HAIRE, 1975; MANOUSSAKIS *et al.*, 1987). A maioria desses anticorpos foi detectada em baixos títulos ($\leq 1:40$) e com isotipo IgM, contudo títulos altos e isotipo IgG também foram encontrados em menor frequência (ANDERSEN, 1977; TOMER & SHOENFELD, 1988; SENEAL *et al.*, 2003).

É importante ressaltar, que a maioria dos estudos que avaliou a frequência populacional de auto-anticorpos investigou positividade para ANA e SMA em doadores de sangue sem investigação sorológica para vírus B e C. Dada a frequência de infecção por vírus hepatotrópicos na população geral, é possível

que boa parte dos indivíduos saudáveis com positividade para auto-anticorpos possa de fato ser portadora de hepatite B ou C.

Por outro lado, vários estudos atuais empregado IFI em células HEp-2 tem demonstrado prevalência de ANA, variando de 1,5%-31,7% na população geral (TAN *et al.*, 1997; AL-JABRI & RICHENS, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2004).

Apenas um estudo avaliou a frequência populacional do AMA, por immunoblotting, encontrando frequência inferior a 1% de anti-M2 em população normal do norte da Itália. O achado de AMA, detectado por IFI, tem relevância clínica maior, uma vez que é considerado um marcador de CBP ou de evolução futura para a doença (METCALF *et al.*, 1996), podendo inclusive ser empregado no rastreamento de CBP em familiares de primeiro grau de portadores da doença (BITTENCOURT *et al.*, 2004).

A prevalência dos anti-LKM1, anti-LC1 na população geral foi pouco estudada e não se tem notícia de nenhum estudo populacional realizado no Brasil sobre a prevalência de auto-anticorpos em indivíduos saudáveis.

3. JUSTIFICATIVA

Na literatura médica, são escassos os estudos de prevalência com base populacional sobre a frequência de auto-anticorpos marcadores de doenças auto-imunes do fígado em indivíduos saudáveis e em portadores de infecção ativa ou pregressa por vírus hepatotrópicos. No Brasil, não encontramos qualquer referência de estudo realizado com estas características.

Dados epidemiológicos sobre a frequência desses auto-anticorpos na população saudável são importantes, uma vez que eles são utilizados rotineiramente como marcadores diagnósticos das doenças auto-imunes do fígado: hepatite auto-imune e cirrose biliar primária. Os auto-anticorpos podem, por outro lado, ser empregados como ferramenta para avaliação da prevalência populacional da hepatite auto-imune e cirrose biliar primária e rastreamento da doença em familiares de primeiro grau de casos-índice. Muito embora estas doenças sejam causas infreqüentes de cirrose hepática em nosso meio, não existem estudos sobre sua prevalência na população brasileira.

Auto-anticorpos hepáticos podem ser observados em cerca de 2% a 66% dos portadores de hepatites virais. A investigação desses auto-anticorpos em população previamente submetida à determinação dos marcadores sorológicos para as hepatites A, B e C em Cavunge-Bahia permitirá correlacionar a ocorrência desses auto-anticorpos com infecção ativa ou pregressa para vírus hepatotrópicos.

4. HIPÓTESE

Auto-anticorpos marcadores de doenças auto-imunes do fígado não ocorrem em população “saudável” e sua presença pode se correlacionar com infecção atual ou pregressa por vírus hepatotrópicos ou doença auto-imune.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de auto-anticorpos não órgão-específicos em uma população rural do nordeste brasileiro (Cavunge-BA).

5.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil dos auto-anticorpos circulantes quanto à sua titulação e padrão de reatividade;
- Correlacionar a ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas: idade, sexo e local de moradia;
- Correlacionar titulação e a ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou pregressa por vírus hepatotrópicos e doença auto-imune;
- Correlacionar a ocorrência de auto-anticorpos com doença auto-imune do fígado;

- Investigar a prevalência de cirrose biliar primária e hepatite auto-imune em população rural do nordeste brasileiro empregando, respectivamente, a determinação do AMA e dos ANA, SMA, anti-LKM1 e anti-LC1 como ferramentas de triagem.

6. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Desenho do Estudo

Estudo prospectivo do tipo corte transversal.

6.2 População de Referência

Moradores do povoado de Cavunge (Bahia)

6.3 População do Estudo

Indivíduos residentes no povoado de Cavunge, selecionados aleatoriamente na lista de visita domiciliar dos agentes de saúde do Programa de Saúde na Família para participação na segunda fase do estudo de prevalência do vírus da hepatite B e C no trópico seco (Cavunge-BA) e no tropico úmido brasileiros (Rio Branco-AC). Foram excluídos do estudo indivíduos com residência fixa por menos de seis meses na vila de Cavunge, indivíduos com doença mental crônico-degenerativa (incapazes de compreender os objetivos do estudo) e pessoas menores de idade sem a presença de seu responsável legal.

6.4 Caracterização da Área e da População de Referência

A população de Cavunge foi selecionada pelo fato do povoado ter sido escolhido desde 1999 como campo de prática do Curso de Pós-Graduação em

Medicina e Saúde (CPgMS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) para realização de atividades em pesquisa e extensão em conjunto com o Programa de Saúde da Família do Município de Ipecaetá (Projeto-Cavunge). O povoado de Cavunge pertence ao município de Ipecaetá, estado da Bahia, que se situa a 162 Km de Salvador e 52 km de Feira de Santana. Possui área de aproximadamente 63.5 km², com limites geográficos precisos, de formato triangular e com os seguintes vértices: rodovia BA-092/rio Curumatar; rio Curumatar/riacho da Formiga e riacho da Formiga/BA-092.

No povoado, foi criada infra-estrutura pelo CPqGM, PRONEX e FAPESB incluindo aluguel de casa com três cômodos e doze leitos, tendo sido fornecidos para o local computador, telefone, freezer a -20° C e centrífuga com verba dos projetos de pesquisa: 1) Estudo da infecção latente e da forma subclínica da leishmaniose visceral em moradores de Cavunge (Ipecaetá, Bahia) financiado pelo CNPq e 2) Estudo de prevalência do vírus da hepatite B e C no trópico seco (Cavunge-BA) e no trópico úmido brasileiros (Rio Branco-AC) financiado pela FUNASA.

Dados sócio-demográficos e alíquotas de soro da população de Cavunge foram obtidos e organizados em base de dados e soroteca em 1999 para realização dos dois projetos supracitados.

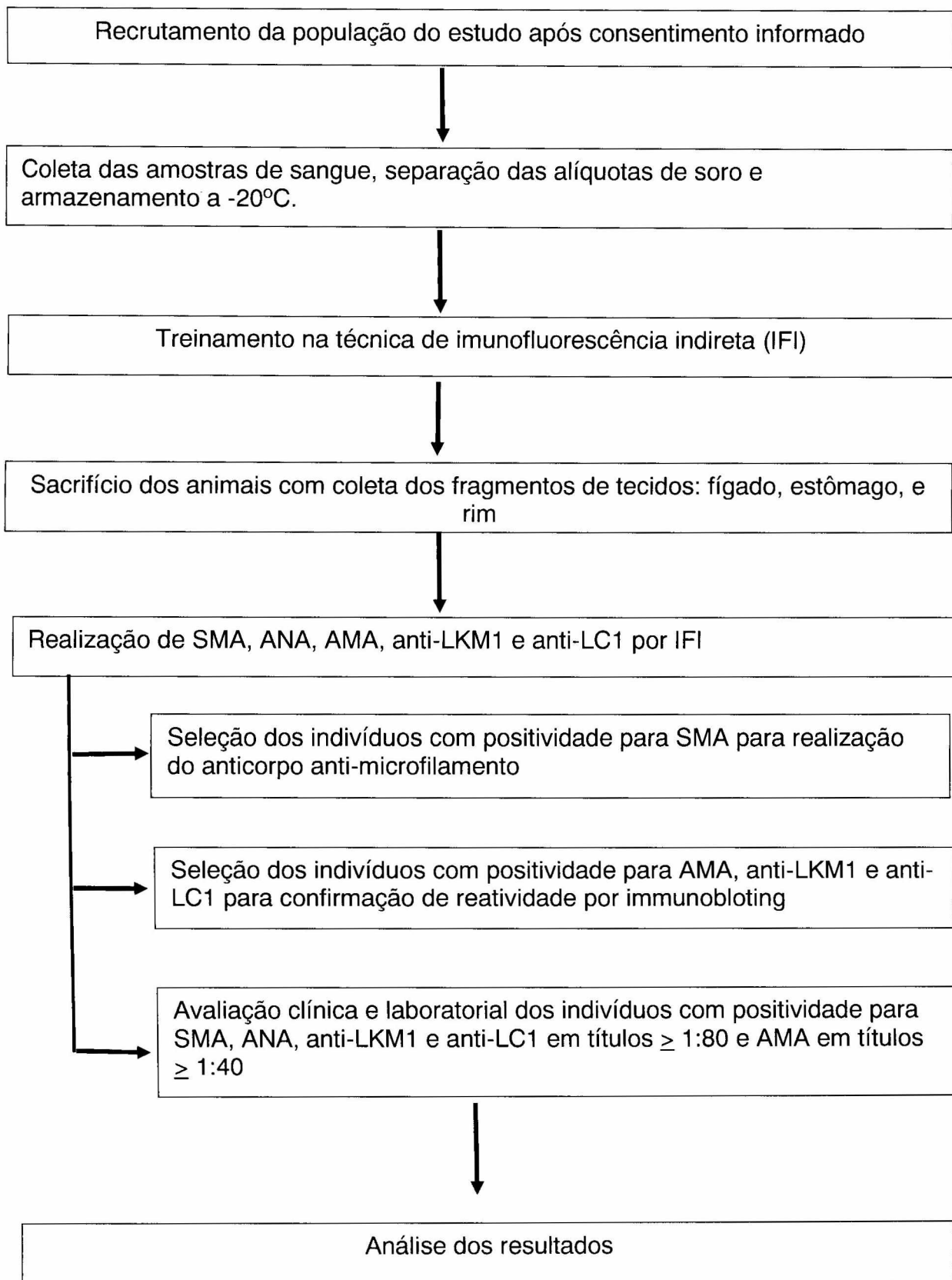
O povoado de Cavunge apresentava em 1999, população de 2.049 indivíduos, sendo que 44,5% (n=911) viviam na sede e 55,5% (n=1.138) na zona rural com idades que variavam de sete dias a 95 anos (TAVARES-NETO *et al.*, 2003). As quatro escolas de Cavunge são do 1º grau e as 12 escolas rurais têm turmas multiseriadas e com professoras despreparadas. Somente os domicílios

da sede do distrito de Cavunge (61%) e de algumas propriedades rurais são servidos pelos serviços de luz elétrica e água; não há serviço de coleta de lixo e nem de esgotamento sanitário. A sede do distrito de Cavunge também não tem casa bancária e o comércio é restrito aos gêneros e bens de primeira necessidade. A economia da região é baseada na agricultura de subsistência (feijão, milho e mandioca). A atividade pecuária é quase sempre restrita às grandes propriedades rurais. Aproximadamente 60% das famílias ganhavam até um salário mínimo (R\$ 151,00), sendo que os moradores da sede do município apresentaram melhor "status alimentar", "status protéico-alimentar" e melhores "condições do domicílio", sugerindo melhor padrão de vida em relação aos habitantes da zona rural (TAVARES-NETO *et al.*, 2003).

A prevalência de marcadores sorológicos de infecção pregressa por vírus da hepatite A, infecção ativa por vírus B e C na população de Cavunge foi de, respectivamente, 83.3%, 2.6% e 0.4% (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Foram consideradas crianças todos os indivíduos com idade inferior a 16 anos.

6.5 Fluxograma do Estudo



6.6 Coleta e Armazenamento das Amostras

Após obtenção de consentimento prévio dos moradores, foram coletadas amostras de 5 ml de sangue periférico de cada indivíduo entre janeiro e dezembro de 2003. O soro foi separado em três alíquotas de 1 ml, uma para a realização de auto-anticorpos e duas para realização de sorologia viral dentro da segunda fase do estudo de prevalência do vírus da hepatite B e C no trópico seco (Cavunge-BA) e no tropico úmido brasileiros (Rio Branco-AC) e conservado em temperatura a -20° C. Posteriormente as amostras de soro foram levadas para o Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz/ BA, onde foram conservadas em freezer a -80° C.

6.7 Identificação dos Auto-Anticorpos

Visando padronização da técnica de realização dos auto-anticorpos antimúsculo liso (SMA), anticitosol hepático tipo 1 (anti-LC1), antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM1) e antimitocôndria (AMA) foi realizado treinamento com Dra. Clarice Abrantes-Lemos, bióloga responsável pela técnica de auto-anticorpos do Laboratório de Investigação Médica do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - previamente à realização do estudo - empregando-se os padrões e critérios adotados pelo Grupo Internacional de Estudo da Hepatite Auto-Imune (VERGANI *et al.*, 2004). O laboratório foi escolhido por ser referência nacional para realização de auto-anticorpos.

6.7.1 Identificação dos SMA, anti-LKM1, anti-LC1 e AMA

A reação de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada em cortes de tecidos de roedores para pesquisa dos auto-anticorpos. Foram utilizadas ratas Wistar jovens, previamente mantidas em jejum antes do sacrifício. Os animais foram previamente anestesiados com solução de Xilazina 10mg/Kg e Ketamina 100mg/Kg por via intraperitoneal (02 ml a cada 100g de peso) e submetidos a procedimento cirúrgico de retirada do fígado, estômago e rins. Os respectivos órgãos foram cortados em pequenos fragmentos, tendo-se o cuidado de desprezar as bordas do fígado e os pólos dos rins, sendo posteriormente congelados em nitrogênio líquido. Para o processamento, o material foi revestido em *tissue teck* e, a seguir, cortado em criostato à temperatura de -20°C com 3 µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas lavadas previamente com extran, sendo conservadas em papel alumínio e mantidas a -20°C até o uso, após terem sido secadas à temperatura ambiente. Para identificação dos padrões de fluorescência, os soros foram diluídos em PBS-*tween* (0,2%) em títulos de 1:40 e 1:80 e, quando positivos, diluídos até titulação máxima. Foram aplicados 100µl das diluições de soro por corte de tecido e incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Depois de um serie de lavagens com PBS, as lâminas foram tratadas com Fluoline H anti-imunoglobulinas humanas marcada com fluoresceína (BioMérieux, REF 75 603), em uma diluição de 1:50. As Lâminas foram montadas com lamínulas, tendo-se o cuidado de previamente aplicar tampão carbonato bicarbonato pH 8.3. Controles positivos para SMA, anti-LKM1, anti-LC1 e AMA obtidos previamente do laboratório de referência foram utilizados nas mesmas

condições descritas acima. A reação foi lida em microscópio Zeiss sob luz UV, com filtros apropriados, utilizando-se as objetivas 10x, 20x, 40x. Os auto-anticorpos foram considerados positivos quando, a partir da diluição 1:40, observou-se padrão de reação fluorescente nos órgãos supracitados de acordo com a metodologia proposta pelo Grupo Internacional de Estudo da Hepatite Auto-Imune (VERGANI *et al.*, 2004).

Reatividade para o SMA foi considerada na identificação de fluorescência nas paredes das veias e artérias do fígado, estômago e rim, assim como também nas camadas musculares do estômago. Os padrões de fluorescência nos cortes de rim foram empregados para estabelecer os padrões vaso (SMA-V), glomérulo (SMA-G), túbulo (SMA-T) do anticorpo antimúsculo liso, respectivamente quando a reação de fluorescência for observada na parede dos vasos renais, nos glomérulos e nos vasos ou nas células tubulares, glomérulos e vasos (Bottazzo *et al.*, 1976).

Reatividade para o anti-LKM1 foi considerada na presença de intensa fluorescência no citoplasma dos hepatócitos com padrão difuso, ao longo de todo o corte e das células dos túbulos renais proximais localizadas na cortical renal.

Reatividade para o AMA foi determinada ao achado de reação fluorescente nas células dos túbulos proximais e distais, preferencialmente nos túbulos distais, observando-se reação na região cortical e medular dos rins. Reação de fluorescência nas células parietais da mucosa gástrica com padrão granular brilhante, apesar de ser achado freqüente nos indivíduos com AMA, não foi considerada isoladamente como padrão para identificação deste auto-anticorpo. O padrão de reatividade no citoplasma dos hepatócitos foi adicionalmente

empregado para diferenciação do AMA e anti-LKM1, pois observa-se fraca marcação no citoplasma de hepatócitos no AMA e forte reatividade citoplasmática no parênquima hepático no anti-LKM1.

Reatividade para o anti-LC1 foi considerada na presença de reação fluorescente no citoplasma dos hepatócitos, com exceção daqueles ao redor da veia centrolobular. Como o padrão de fluorescência do anti-LKM1 obscurece a reatividade para o anti-LC1, investigação da presença do anti-LC1 em portadores de anti-LKM1 será eventualmente avaliada por immunoblotting.

6.7.2 Identificação do ANA

A pesquisa do ANA ou “pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares” (PAAC) foi realizada por técnica de imunofluorescência indireta em células HEP-2 empregando-se o kit comercial FAN Anti-Nuclear antibodies HEP-2 (Biosystems, ref. 44509, lote:231AA). Esta estratégia foi adotada pelo baixo custo e dificuldade conhecida de padronização da técnica em laboratório clínico. Para identificação dos padrões de fluorescência, os soros foram diluídos em títulos de 1:40 e 1:80 e, quando positivos, diluídos até titulação máxima. A leitura da técnica seguiu a denominação realizada no II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEP-2 (DELLAVANCE *et al.*, 2003) que define os padrões em nucleares, nucleolares, citoplasmáticos, relacionados com o aparelho mitótico e mistos (Anexo-III). Os resultados seguiram também as novas recomendações adotadas para padronização do ensaio de pesquisa de auto-anticorpos em células HEP-2, controle de qualidade e associações clínicas definidas no 3º Consenso Brasileiro

para pesquisa de auto-anticorpos em células HEp-2 (FAN) (DELLAVANCE *et al.*, 2009).

6.7.3 Identificação do anticorpo anti-microfilamento

A pesquisa de anticorpo anti-microfilamento (AAMF) foi realizada apenas nos indivíduos com reatividade para o SMA independentemente do padrão de reatividade (vaso, glomérulo ou túbulo). Foram separadas alíquotas de soro de 100 µl dos casos positivos, sendo enviadas para o Laboratório de Investigação Médica do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para determinação de AAMF de acordo com a técnica de inativação pelo calor empregando como substrato fibroblastos humanos (CANÇADO *et al.*, 1996; Cançado *et al.*, 2001). Os fibroblastos foram cultivados em meio Eagle acrescido de soro fetal bovino, durante 24-36 horas, em uma atmosfera de 5% de CO₂. A pesquisa do AAMF foi realizada inicialmente nas diluições de 1:10, e se positiva realizada até titulação máxima positiva. As amostras de soro a serem utilizadas para pesquisa do AAMF, foram preparadas com inativação do soro pelo calor a 56°C ou diluídas em solução quelante de cálcio (PBS/EDTA a 0,034M) (CANÇADO *et al.*, 1996). Foram realizadas reações em duplicata, com diluições a 1:10 em PBS ou PBS/EDTA. Vinte µl da diluição foi adicionado a cada espaço circular nas lâminas com fibroblastos. Estas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e a seguir lavadas com PBS por 5 minutos duas vezes. Foi adicionado o conjugado, anti-imunoglobulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína diluída em PBS, sendo os fibroblastos

incubados por mais 30 minutos, a 37°C e realizado duas lavagens subseqüentes com PBS, como anteriormente descrito. As lâminas foram então, cobertas com glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi realizada por dois observadores fixos, ao microscópio de fluorescência de epiluminação com filtro de interferência 5/5W e filtro de barreira. A presença de fibras dispostas em sentido retilíneo (“stress fibers”) no citoplasma definiu a positividade do AAMF, a partir da diluição 1:40 (PEDERSEN *et. al.*, 1982; LAZARIDES & WEBER, 1994; CANÇADO *et al.*, 2001).

6.7.4 Identificação do Anticorpo Anti-M2 e anti-LKM1 e anti-LC1 por Immunoblotting.

A pesquisa de anti-M2 foi realizada apenas nos indivíduos com reatividade para o AMA. Foram separadas alíquotas de soro de 100 µl dos casos positivos, sendo enviadas para o Laboratório de Investigação Médica do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para determinação do anti-M2.

Para determinação do anti-M2, foram empregados como antígeno, mitocôndrias extraídas de coração bovino de acordo com a técnica de De Duve *et al* (1955). O coração bovino foi retirado, lavado em tampão Tris 0,05 M, pH 7,4 e cortado em pequenos pedaços. Um volume de coração foi misturado a nove volumes de solução de sacarose 0,25 M, Tris 0,05 M, pH 7,4 e, a seguir, colocado no homogeneizador, que foi acionado apenas três vezes, a fim de não haver rompimento das organelas. Todo o processo foi realizado a 4°C. O homogeneizado foi inicialmente centrifugado a 60 g durante dez minutos. Nesta

fase, há sedimentação dos fragmentos de tecidos não homogeneizados e dos eritrócitos. O sobrenadante é constituído por núcleos, lisossomos, mitocôndrias, microssomas e citoplasma. Esse sobrenadante foi centrifugado a 600 g durante dez minutos, permitindo a separação de um sedimento de cor bege, rico em núcleos e de um sobrenadante, que foi novamente centrifugado a 8500 g por mais dez minutos.

Obteve-se, após essa etapa, um sedimento de cor marrom, rico em mitocôndrias. Essas mitocôndrias são denominadas pesadas, em contraste com as mitocôndrias ditas leves, obtidas no sedimento da centrifugação a 17.500 g, que não foram utilizadas porque esta fração contém também lisossomos. As mitocôndrias pesadas foram lavadas três vezes em solução de sacarose 0,25 M e suspensas em 2 ml de tampão Tris 0,05 M, pH 7,4. A concentração protéica da amostra, determinada pela técnica do biureto, foi de 6,0 g/100 ml. As mitocôndrias foram divididas em alíquotas e armazenadas à temperatura de -20°C e utilizadas no período de dois meses. Os antígenos mitocondriais foram sonicados imediatamente antes do uso por 5 vezes durante 30 segundos, a 50 W, a 4°C. As mitocôndrias foram diluídas em tampão constituído por 62,5 mM de tris-HCl, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2%, β -mercaptoetanol e azul de bromofenol 0,5% (w/v).

Padrões de peso molecular, obtidos comercialmente, contendo miosina de músculo de coelho (205 kD), β -galactosidase de *Escherichia coli* (116 kD), fosforilase B de músculo de coelho (97,4 kD), albumina bovina (66 kD), albumina de ovo (45 kD) e anidrase carbônica de eritrócitos bovinos (29 kD) foram utilizados, após reconstituição segundo as instruções do fabricante.

Os antígenos foram fervidos por cinco minutos a 100°C e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se gel de empilhamento a 4% e gel de corrida a 10%. Foram aplicados 200 µg de proteína por minigel. A corrida foi realizada, a 200 volts, à temperatura ambiente, em tampão constituído por 25 mM de Tris, 192mM de glicina e 0,1% de SDS, pH 8,3, utilizando-se o equipamento *Mini-Protean II* até o corante migrar à extremidade inferior do gel (aproximadamente 45 minutos).

A separação adequada das proteínas no gel foi verificada mediante a coloração pelo *coomassie brilliant blue R*. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose de poro 0,45 µ foi realizada após a montagem do sanduíche com o gel, a membrana de nitrocelulose e seis folhas de papel de filtro em tampão de Towbin (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20% de metanol, pH 8,3), utilizando-se o equipamento *semi-dry Biorad*, a 5,5 mA por cm², durante 30 minutos¹¹⁶.

A membrana foi corada com Ponceau S a 0,1% em ácido acético a 5%, cortada em fitas de 3 mm e, a seguir, bloqueada com leite desnatado a 5% diluído em tampão contendo Tris HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,9% e tween 20 a 0,05% (TNT) durante uma hora, a 37°C, sob agitação constante.

Procedeu-se a incubação das fitas com soros diluídos a 1/200 no tampão TNT, durante duas horas, sob agitação constante. Após três lavagens com o mesmo tampão, durante dez minutos, sob agitação, as fitas foram incubadas com antilgG e antilgM humanas, diluídas 1/1000 em tampão TNT, durante 60 minutos. Após mais três lavagens como descrito acima, a reação foi revelada com solução contendo 20 ml de Tris-HCl 50mM, pH 7,0, 12 mg de 4-cloronaftol, 4 ml de

metanol e 12 µl de água oxigenada 30% até o surgimento das bandas e interrompida a seguir com água destilada. Toda a reação foi realizada à temperatura ambiente. O IB foi considerado positivo quando se identificou reatividade contra qualquer banda do complexo 2-oxoácido desidrogenase.

Na presença de positividade para anti-LKM1 e anti-LC1 foi prevista realização de confirmação de reatividade destes auto-anticorpos por immunoblotting, empregando-se, respectivamente, antígenos microssomais de fígado de rata e antígenos citosólicos de fígado humano, sendo considerado resultado positivo para anti-LKM1 a presença de qualquer uma das três bandas de 50kD, 56kD e 66kD isoladas ou associadas entre si (ALVAREZ *et al.*, 1985; CORDONER-FRANCH *et al.*, 1989) e positividade para o anti-LC1 o achado da banda de 62kD (ABUAF *et al.*, 1992).

6.8 Avaliação Clínica e Laboratorial dos Indivíduos com Auto-Anticorpos

Os indivíduos que apresentaram positividade para SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 na titulação maior ou igual a 1:80 e AMA na titulação maior ou igual a 1:40 foram submetidos a avaliação clínico-laboratorial. Estes títulos foram considerados como de relevância clínica potencial por serem empregados para triagem diagnóstica da HAI e CBP de acordo com os critérios do Grupo Internacional de Estudo da HAI (VERGANI *et al.* 2004; HENNES *et al.* 2008) e da *American Association for the Study of the Liver* (CZAJA & FREESE, 2002; HEATHCOTE, 2000).

Os indivíduos foram entrevistados e avaliados através de exame físico no seu domicílio por dois médicos participantes do estudo empregando uma ficha de avaliação pré-definida (vide anexo II) visando investigar presença de sinais e sintomas de enfermidade hepática e/ou doença auto-imune. Foi realizada nova coleta no local de 5 ml de sangue para separação de 3 alíquotas de soro visando determinar perfil bioquímico hepático e sorologia viral, que foram armazenadas em freezer a -20° C para transporte para Salvador. Foi realizada em todos os indivíduos com positividade para auto-anticorpo dosagem de fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT) e proteínas totais e frações (PT e frações), empregando-se kits comerciais, no laboratório LPC.

6.9 Avaliação de Marcadores Sorológicos de Infecção Viral Progressiva ou Atual

A pesquisa de agHBs, anti-HBc IgG, anti-HBs, anti-HAV IgG e do anti-HCV por ELISA de terceira geração (ELISA III) foi previamente realizada empregando-se kits comerciais (Roche, Basel-Switzerland) em 1790 amostras de soro colhidas em 1999 de moradores de Cavunge dentro da fase inicial do projeto estudo de prevalência do vírus da hepatite B e C no trópico seco (Cavunge-BA) e no tropico úmido brasileiros (Rio Branco-AC) (ALMEIDA *et al.*, 2006). Uma alíquota de soro da coleta realizada para o presente estudo entre janeiro e dezembro de 2003 foi separada para nova determinação de agHBs; anti-HBc IgG, anti-HBs, anti-HAV IgG e anti-HCV visando complementar dados para realização de estudo sentinela

sobre hepatites virais dentro do mesmo projeto acima citado. Como as novas determinações não foram realizadas até a conclusão do presente estudo, foram utilizados os resultados de sorologia viral da coleta de 1999 para correlacionar perfil de auto-anticorpos e estado de infecção atual ou pregressa por vírus hepatotrópicos. Adicionalmente, foi realizada determinação de agHBs; anti-HBc IgG, anti-HBs, anti-HAV IgG e anti-HCV por kits comerciais no Laboratório Central da Bahia (LACEN) em todo indivíduo com positividade para auto-anticorpos com títulos de relevância clínica potencial (maior ou igual a 1:40 para SMA, anti-LKM1, anti-LC1, ANA e AMA).

6.10 Análise Estatística

O programa de análise estatística Epi Info™, versão 3.5.1 foi utilizado para interpretação dos dados. As variáveis contínuas foram expressas em mediana valor mínimo e valor máximo e as variáveis categóricas em frequências e percentuais. Os testes estatísticos aplicados foram o do qui-quadrado com a correção de Yates para testar diferenças entre proporções e, para comparação da distribuição entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann Whitney. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.11 Aspectos Éticos

A execução do projeto foi apresentada pelo Comitê de Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (credenciado pelo CONEP). Apenas participaram do estudo indivíduos que assinaram o termo de consentimento informado.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização da população estudada

Foram avaliados 725 indivíduos (369 mulheres, com prevalência de idade de 23 anos com distribuição que variou entre 7dias-91anos). Trinta e nove por cento apresentavam idade inferior a 16 anos e foram considerados como dentro da faixa etária pediátrica. A maioria (73%) habitava zona rural do município. Os dados demográficos da amostragem da população estudada do povoado de Cavunge estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Dados Demográficos da População Estudada do Município de Cavunge.

N	725
% população estimada em Cavunge (n=2.049*)	35%
Sexo feminino	369 (51%)
Idade	23 anos [7d-91a]
Idade inferior a 16 anos	39%
Residência em sede do município	27%
Residência em zona rural	73%
Fazenda Alto Alegre	2,2%
Fazenda Alto do Meio	2,2%
Fazenda Barrocão	0,9%
Fazenda Boca da Mata	8,6%
Fazenda Bom Sucesso	3,2%
Fazenda Cavunge	27%
Fazenda Cágados	0,9%
Fazenda Chapada	3,7%
Fazenda Guanabara	0,4%
Fazenda Jurubeba	1,5%
Fazenda Lagoa do Boi	8,4%
Fazenda Manuíno	3%
Fazenda Pedrinha	0,9%
Fazenda Pindobal	1,3%
Fazenda Pituba	10,8%
Fazenda Riacho da Formiga	1,9%
Fazenda Riacho Seco	4,3%
Fazenda Santa Maria	8%
Fazenda Sítio Novo	4,1%
Fazenda Umbuzeiro	1,9%
Fazenda Umbuzeiro 2	0,4%

* De acordo com censo de 1999 (Tavares *et al.*, 2003).

7.2 Pesquisa de auto-anticorpos

Cento e um indivíduos (14%) apresentaram reatividade para auto-anticorpos. Positividade para os SMA, ANA e AMA foi observada, respectivamente, em 74 (10,2%); 32 (4%) e 1 (0,1%) indivíduos. Seis apresentaram reatividade simultânea para SMA e ANA. Não foi observada reatividade para anti-LKM1 e anti-LC1 em nenhuma amostra avaliada.

Setenta e dois indivíduos apresentaram auto-anticorpos com títulos iguais a 1:40, enquanto que 29 (23 com SMA e 6 com ANA) exibiram títulos considerados de potencial relevância clínica ($\geq 1:80$). Apenas um indivíduo com ANA em titulação de 1:320 e SMA em titulação 1:80 apresentou titulação de auto-anticorpos superior a 1:80.

Os padrões de fluorescência observados nos portadores de SMA foram de padrão vaso e glomérulo, respectivamente, em 59 (80%) e 15 (20%) indivíduos. Não foi observada reatividade para padrão túbulo.

A presença de anticorpo anti-microfilamento foi rastreada em todas as amostras positivas para SMA, sendo observada reatividade em baixo título 1:20 apenas em um indivíduo com SMA padrão glomérulo em titulação 1:80.

Os padrões de fluorescência observados nos portadores de ANA foram: nuclear pontilhado grosso (n=27), nucleolar homogêneo (n=2), citoplasmático fibrilar (n=2) e nuclear homogêneo (n=1).

A correlação entre padrão de reatividade e titulação dos SMA e ANA está descrita na tabela 2.

Apenas um indivíduo do sexo feminino apresentou positividade para o AMA (0,1%) na IFI com titulação igual a 1:80. A pesquisa do anti-M2 por immunoblotting, no entanto, resultou negativa.

Tabela 2: Correlação entre padrão de reatividade e titulação dos SMA e ANA

	Titulação de Auto-Anticorpos		
	1:40	1:80	1:320
Auto-anticorpos (n=101)	72 (71%)	28 (28%)	1 (0,9%)
SMA (n=74)	51 (69%)	23 (31%)	0 (0%)
Padrão vaso (n=59)	43 (58%)	16 (22%)	
Padrão glomérulo (n=15)	8 (11%)	7 (9%)	
ANA (n=32)	26 (81%)	5 (16%)	1 (3%)
Nuclear pontilhado grosso (n=27)	26 (81%)	1 (3%)	
Nucleolar homogênio (n=2)		1 (3%)	1 (3%)
Citoplasmático fibrilar (n=2)		2 (6%)	
Nuclear homogênio (n=1)		1 (3%)	

7.3 Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas

Indivíduos com auto-anticorpos positivos apresentaram idade significativamente maior (25 [6meses-91anos] anos vs. 23 [7dias-85anos] anos nos indivíduos sem auto-anticorpos, $p = 0,05$) e maior preponderância do sexo feminino (72% vs. 48% nos indivíduos sem auto-anticorpos, $p = 0,00002$) quando comparados a aqueles sem reatividade para auto-anticorpos (Tabela 3). Não houve diferença na frequência de auto-anticorpos nos moradores da sede do município e da zona rural de Cavunge. (Tabela 3) Não houve também associação entre título de auto-anticorpos e idade, sexo ou tipo de moradia (Tabela 3). As frequências de auto-anticorpos, SMA e ANA foram de 12,5%, 8,5% e 5,1% em crianças e 15,7%, 11,1% e 4,6% em adultos, não se observando diferença estatisticamente significativa.

Avaliação separada da distribuição dessas variáveis demográficas, de acordo com o tipo de auto-anticorpo circulante, revelou que a associação de idade com positividade para auto-anticorpos foi restrita àqueles indivíduos com SMA (27 [1-91anos] anos vs. 23 [7dias-85anos] anos nos indivíduos sem auto-anticorpos, $p=NS$), mas a diferença não permaneceu significativa possivelmente pelo tamanho reduzido da amostra (Tabela 3). A maior preponderância do sexo feminino, por outro lado, foi observada nos indivíduos com SMA e ANA (Tabela 3).

Não foi evidenciada associação com variáveis demográficas e título de auto-anticorpos. Observou-se maior de idade e maior frequência de domicílio na

sede do município em indivíduos com ANA com títulos iguais ou superiores a 1:80, quando comparados com aqueles com título igual a 1:40, porém a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 3: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas.

	Auto-anticorpos Positivos			Auto-anticorpos Negativos
	Total (n=101)	SMA (n=74)	ANA (n=32)	Total (n=624)
Variáveis Demográficas				
Idade (anos)	25[6m-91a] ^a	27[1-91a] ^b	18[6m-81a] ^c	23[7d-85a] ^y
Sexo Feminino	72 (72) ^d	53 (72) ^e	23 (72) ^f	297 (48) ^z
Moradia				
Sede do Município	27%	23%	31%	26%
Zona Rural	73%	77%	69%	74%

Os números entre parênteses estão expressos em porcentagem. As letras em sobrescrito indicam valores estatisticamente significantes ^{ay} p = 0,053; ^{by} p = NS; ^{cy} p = NS; ^{dz} p = 0,00001624; ^{ez} p = 0,00027180; ^{fz} p = 0,02462921

Tabela 4: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com variáveis demográficas de acordo com o título.

	Auto-anticorpos Positivos					
	Total (n=101)		SMA		ANA	
	1:40	≥ 1:80	1:40	≥ 1:80	1:40	≥ 1:80
Variáveis Demográficas						
Idade (anos)	25[6m-91a]	23[3-78a]	35[1-91a]	14[3-78a]	17[6m-81]	44[14-70a]
Sexo Feminino	71%	72%	71%	74%	73%	67%
Moradia						
Sede do Município	25%	32%	24%	21%	14%	75%
Zona Rural	75%	68%	76%	79%	86%	25%

7.4 Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou progressa por vírus hepatotrópicos.

Apenas 330 (45%) indivíduos participantes do presente estudo tiveram resultados de sorologia viral disponibilizados para a correlação entre ocorrência de auto-anticorpos circulantes e infecção ativa ou progressa por vírus hepatotrópicos. Os exames sorológicos foram realizados no estudo paralelo sobre prevalência do vírus da hepatite B e C no trópico seco (Cavunge-BA) e no tropico úmido brasileiros, cuja segunda fase ainda não foi finalizada.

Não foi observada correlação entre infecção progressa ou ativa por vírus hepatotrópicos e auto-anticorpos circulantes, assim como também com infecção progressa isolada por vírus A (definida pela positividade para IgG anti-HAV) e

infecção atual (definida pela positividade para AgHBs) ou pregressa (definida pela positividade para IgG anti-HBc total e/ou anti-HBs) por vírus B. Não houve também associação entre infecção viral e tipo de auto-anticorpo: SMA ou ANA (Tabela 5). Apenas um indivíduo apresentou positividade para anticorpo anti-HCV. Ele também exibiu reatividade para SMA padrão vaso na titulação de 1:40. A frequência de infecção viral atual ou pregressa foi semelhante nos grupos de indivíduos a despeito da presença de auto-anticorpos circulantes, mas foi significativamente maior nos indivíduos com títulos de auto-anticorpos e de SMA de 1:40 quando comparados com aqueles com títulos iguais ou superiores a 1:80 (Tabela 6).

Tabela 5: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou pregressa por vírus hepatotrópicos

Sorologia viral	Auto-anticorpos Positivos			Auto-anticorpos Negativos
	Total (n=80)	SMA (n=59)	ANA (n=25)	Total (n=225)
Positiva (IgG anti-HAV e/ou AgHBs e/ou Anti-HBc total e/ou Anti-HBs e/ou Anti-HCV)	94%	92%	96%	88%
IgG anti-HAV	75%	75%	72%	78%
AgHBs	2,2%	1,6%	3,3%	0,3%
Anti-HBc total	11%	10%	6%	12%
AgHBs e/ou Anti-HBc total e/ou Anti-HBS	18%	16%	15%	19%
Anti-HCV	1%	2%	0	0

Tabela 6: Correlação da ocorrência de auto-anticorpos com infecção ativa ou pregressa por vírus hepatotrópicos de acordo com o título.

	Auto-anticorpos Positivos						Auto-anticorpos Negativos
	Total		SMA		ANA		
Sorologia viral	1:40	≥ 1:80	1:40	≥ 1:80	1:40	≥ 1:80	
Positiva (IgG anti-HAV e/ou AgHBs e/ou Anti-HBc total e/ou Anti-HBS e/ou Anti-HCV)	98% ^a	83% ^b	98%	77%	95%	100%	88% ^y
IgG anti-HAV	76% ^c	71% ^d	81%	64%	65%	100%	78% ^z
AgHbs	1%	4%	2%	0	0	20%	0,3%
Anti-HBc total	10%	11%	11%	8%	8%	0	12%
AgHBs e/ou Anti-HBc total e/ou Anti-HBs	19%	18%	17%	15%	20%	0	19%
Anti-HCV	1%	0	0	0	0	0	0

Os números entre parênteses estão expressos em porcentagem. As letras em sobrescrito indicam valores estatisticamente significantes ^{ay} p = NS; ^{ab} p = 0,03; ^{cz} p = NS; ^{cd} p = 0,02.

7.5 Correlacionar a ocorrência de auto-anticorpos com doença auto-imune.

Foi investigada presença de doença auto-imune em 24 (17 mulheres com idade prevalente de 22 anos, com mediana apresentando um mínimo de 02 anos e máximo de 86 anos) indivíduos que apresentaram positividade para SMA e ANA na titulação maior ou igual a 1:80 e AMA na titulação maior ou igual a 1:40. Estes

títulos foram previamente definidos como de relevância clínica potencial para triagem diagnóstica de HAI e CBP.

Durante a coleta foi possível localizar 13 (onze mulheres) dos 24 indivíduos com auto-anticorpos de potencial relevância clínica. Estes indivíduos foram submetidos a avaliação clínica através da aplicação do questionário, exame físico e investigação laboratorial de doença hepática. Os resultados desta análise estão resumidos na tabela 7. Na avaliação clínica um indivíduo referiu artralgia em articulações metacarpofalangeanas, um artralgia e artrite em metatarsofalangeanas além de aftas orais e outro fotossensibilidade. Um indivíduo apresentava paralisia de membro superior (Tabela 7). Onze indivíduos não foram avaliados clinicamente devido a: impossibilidade de localização (n=8); recusa em continuar participando do estudo (n=1) e óbito por leishmaniose visceral (n=1) (Tabela 8).

A avaliação laboratorial foi realizada em todos os 24 indivíduos ($\geq 1:80$), empregando novas amostras de soro nos indivíduos submetidos a coleta e amostras de soro previamente armazenadas em freezer a -20°C com posterior transferência para freezer -80°C naqueles indivíduos que não foram submetidos a coleta e avaliação clínica (Tabela 8).

Foram observados elevação dos níveis de proteínas totais em 19 indivíduos; hipalbuminemia em 1 e hiperglobulinemia em 19 (Tabelas 7 e 8).

Apenas um indivíduo (número 14), que não foi localizado para avaliação clínica e reavaliação laboratorial, apresentou alteração isolada na AST 1,1 vez o

valor normal de referência. Ele exibiu reatividade para SMA padrão vaso na titulação de 1:80.

Não foram encontradas alterações clínicas e laboratoriais nos indivíduos com positividade para SMA, ANA em títulos \geq 1:80 e AMA em títulos \geq 1:40 que estivessem dentro dos critérios adotados para o diagnóstico de HAI e CBP (ALVAREZ, 1999; CZAJA & FREESE, 2002; HEATHCOTE, 2000). O indivíduo do sexo feminino com AMA a IFI não apresentava colestase e não teve reatividade para anti-M2 ao immunoblotting. Desta forma não foi identificado nenhum indivíduo com HAI ou CBP na amostragem estudada da população do povoado de Cavunge.

Tabela 7. Características demográficas, laboratoriais e clínicas dos indivíduos com positividade para SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 em títulos \geq 1:80 e AMA em títulos \geq 1: 40 na IFI.

Número	Idade	Sexo	FA (U/L)	PT (g/dL)	Alb (g/dL)	GL (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	Anti HCV	Anti HAV	AgHBs	Alterações Clínicas	AA	Título
2	78	F	83	7.7	4.0	3.7	18	35	14	0	1	0	ausentes	ANA	1:80
3	6	F	324	7.2	4.1	3.1	35	39	25	0	0	0	ausentes	SMA (G)	1:80
4	46	F	77	8.2	4.3	3.9	20	38	25	0	1	0	Artralgia e artrite (pés) e aftas orais	SMA (V)	1:80
5	4	F	271	7.9	4.2	3.7	31	31	22	0	1	0	ausentes	SMA (G)	1:80
6	3	F	300	7.5	4.4	3.1	30	31	21	0	1	0	fotosensibilidade	SMA (G)	1:80
7	9	F	368	7.4	4.2	3.2	29	30	20	0	1	0	ausentes	SMA (G)	1:80
8	39	F	84	8.4	4.8	3.6	22	31	30	0	1	0	ausentes	AMAF SMA (G)	1:20 1:80
10	67	F	99	8.6	4.3	4.3	26	34	26	0	1	0	Artralgia em dedos das mãos	SMA (V)	1:80
12	8	F	269	7.5	4.4	3.1	29	31	13	0	0	0	ausentes	SMA (G)	1:80
16	13	F	268	8.2	4.8	3.4	29	26	13	0	0	0	ausentes	SMA (V)	1:80
18	2	F	252	7.2	4.5	2.7	33	30	11	0	0	0	ausentes	SMA (V)	1:80
20	19	M	84	7.9	4.6	3.3	25	29	20	0	1	0	Paralisia em membro superior esquerdo	SMA (V)	1:80
23	13	M	353	8.1	4.3	3.8	29	34	22	0	0	0	ausentes	SMA (V) ANA	1:80 1:40

1-positivo; **0**-negativo; **F**-feminino; **M**-masculino; ; **FA**: -fosfatase alcalina (2 a 12 anos: 102 a 400 U/L; > 18 anos: 17 a 142 U/L); **P.T.**-proteínas totais (VR: (5.9 a 7.4 g/dL); **Alb**:-albumina (VR: 3.5 a 5 g/dL); **GL**:-globulina (VR: 2.6 a 3.1 g/dL); **AST**:-aspartato aminotransferase (VR: 15 A 37U/L); **ALT**:-alanina aminotransferase (VR: 30 a 65 U/L); **GGT**:-gama glutamil transferase (VR: 5 a 85 U/L); **AA**: auto-anticorpos; **AAMF**: anticorpo anti-microfilamento; **SMA**: anticorpo antimusculo liso; **V**: padrão vaso;**G**: padrão glomérulo, **ANA**: anticorpo antinucleo; **AMA**: anticorpo antimitocondria.

Tabela 8. Características demográficas, laboratoriais e clínicas dos indivíduos com positividade para SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 em títulos \geq 1:80 e AMA em títulos \geq 1:40 na IFI.

Número	Recoleta	Idade	Sexo	FA (U/L)	PT (g/dL)	Alb (g/dL)	GL (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	Anti HCV	Anti HAV	AgHBs	Alterações Clínicas	AA	título
1	recusou	67	F	64	7.8	4.2	3.6	22	22	18	0	1	0	-	AMA	1:80
9	Não localizado	17	F	144	8.2	4.7	3.5	21	21	16	0	1	0	-	SMA (V)	1:80
11	Não localizado	32	F	88	8.8	4.2	4.6	20	18	15	0	1	0	-	ANA SMA (V)	1:320 1:80
13	viajando	36	M	60	7.8	4.4	3.4	29	25	26	0	1	0	-	SMA (G)	1:80
14	Não localizado	37	M	75	8.1	4.6	3.5	40	22	47	0	1	0	-	SMA (V)	1:80
15	Não localizado	75	M	61	7.1	4.1	3.0	26	22	66	0	1	0	-	SMA (V)	1:80
17	viajando	22	M	95	8.1	4.9	3.2	25	23	22	0	1	0	-	ANA	1:80
19	Faleceu (Calazar)	5	F	89	7.3	3.2	4.1	25	21	19	0	0	0	-	SMA (V)	1:80
21	Não localizado	86	F	53	7.8	4.1	3.7	32	23	20	0	1	0	-	SMA (V)	1:80
22	viajando	19	F	65	7.7	4.4	3.3	20	26	15	0	0	0	-	SMA (V)	1:80
24	Não localizado	62	F	67	8.3	4.3	4.0	32	39	50	0	1	0	-	SMA (V)	1:80

1-positivo; 0-negativo; F- feminino; M-masculino; ; FA: -fosfatase alcalina (2 a 12 anos: 102 a 400 U/L; > 18 anos: 17 a 142 U/L); P.T.-proteínas totais (VR: (5.9 a 7.4 g/dL); Alb.:-albumina (VR: 3.5 a 5 g/dL); GL:-globulina (VR: 2.6 a 3.1 g/dL); AST:-aspartato aminotransferase (VR: 15 A 37U/L); ALT:-alanina aminotransferase (VR: 30 a 65 U/L); GGT:-gama glutamyl transferase (VR: 5 a 85 U/L); AA: auto-anticorpos; AAMF: anticorpo anti-microfilamento; SMA: anticorpo antimusculo liso; V: padrão vaso;G: padrão glomérulo; ANA: anticorpo antinucleo; AMA: anticorpo antimitocondria.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou prevalência de 14% de auto-anticorpos na população de Cavunge-Bahia, sendo observada freqüência de SMA, ANA e AMA de, respectivamente, 10,2%, 4% e 0,1% e ausência de reatividade para anti-LKM1 e anti-LC1. Estas freqüências são inferiores àquelas observadas na maioria dos estudos publicados na literatura (HOOPER *et al.*, 1972; TEUBNER *et al.*, 2002; AL-JABRI *et al.*, 2003; FERNANDEZ *et al.*, 2003; HILÁRIO *et al.*, 2004; WANANUKUL *et al.*, 2005), mas é importante ressaltar a grande variabilidade observada na freqüência destes auto-anticorpos em indivíduos saudáveis, que oscilou entre 1,5% a 43% em diferentes investigações publicadas desde o início da década de 80 (Tabelas 9-12).

Esta heterogeneidade relatada em diferentes casuísticas pode ser decorrente de vários fatores, incluindo diferenças na metodologia desses estudos; falta de padronização da técnica de IFI; presença de variáveis étnicas, geográficas e socioeconômicas distintas, assim como também influência de outras condições subjacentes na expressão desses auto-anticorpos.

A maioria dos estudos realizados, até o momento, incluiu doadores de sangue ou indivíduos saudáveis selecionados sem critérios definidos ou como grupo-controle de estudos sobre prevalência de auto-anticorpos em diferentes doenças auto-imunes e infecciosas (Tabelas 9-12). Apenas dois estudos de base populacional foram, até o momento, publicados na literatura, apresentando resultados semelhantes ao nosso. Hooper *et al.* (1972) realizaram inquérito sorológico investigando um painel de cerca de sete auto-anticorpos em 3492

indivíduos da cidade de Busselton, Austrália (aproximadamente 90% da população local). Os autores empregaram um critério semi-quantitativo para definição de positividade para auto-anticorpos que não foi baseado na sua titulação. Encontraram positividade para diversos auto-anticorpos, ANA e SMA em, respectivamente, 22%, 2% e 1,5% dos casos. Njemini *et al.* (2002) avaliaram a freqüência de nove auto-anticorpos incluindo SMA, ANA e AMA em 152 idosos com idade superior a 60 anos, moradores de uma comunidade de 4.267 habitantes. Encontraram reatividade para ao menos um auto-anticorpo em 49% dos indivíduos e positividade para o SMA, ANA e AMA em, respectivamente, 9%, 9% e 1%.

A divergência nos resultados desses diferentes estudos (Tabelas 10-11) também pode ser atribuída à falta de padronização na técnica de detecção de auto-anticorpos por IFI em cortes de tecidos de roedores, incluindo uso de diferentes substratos, conjugados e reagentes e a reconhecida subjetividade inerente à técnica de IFI, que é observador-dependente e de acurácia variável diretamente proporcional à experiência e capacidade de interpretação do examinador e à qualidade de microscópio de imunofluorescência. A pesquisa de ANA por IFI empregando-se células HEp-2 apresenta maior sensibilidade, quando comparada com a mesma técnica com uso de cortes de tecidos de roedores como substrato. A maioria dos estudos, por outro lado, empregou IFI, mas alguns fizeram uso de outras técnicas tais como imunodifusão radial, immunoblotting e ELISA. Os títulos empregados para rastreamento inicial e para definição de positividade também foram muito distintos variando de 1:1 a 1:40 e de 1:10 a 1:80 nos diferentes estudos, respectivamente (Tabelas 10-11).

Visando reduzir a variabilidade observada em diferentes laboratórios na detecção de auto-anticorpos em pacientes com HAI, recentemente, o Grupo Internacional de Estudo da Hepatite Autoimune publicou recomendações visando a padronização da técnica de IFI para detecção de SMA, ANA, anti-LKM1 e anti-LC1 (VERGANI *et al.*, 2004). Nosso estudo foi à primeira investigação de auto-anticorpos em indivíduos saudáveis empregando essas recomendações com algumas pequenas modificações. Não empregamos diluições de rastreamento diferentes em crianças (1:10) e adultos (1:40) e utilizamos células HEp-2 como substrato para detecção do ANA por IFI.

A variabilidade na expressão desses auto-anticorpos na população normal também deve ser influenciada por variáveis étnicas, geográficas e socioeconômicas. Infecções de transmissão fecal-oral, como hepatite por vírus A, que refletem condições deficientes de saneamento básico, se associam a maior frequência de auto-anticorpos circulantes (CODES *et al.*, 2002; FAINBOIM *et al.*, 2001). Por outro lado, é conhecida a associação de auto-anticorpos com doenças que apresentam alta prevalência em algumas populações tais como hepatite C (LENZI *et al.* 1999; CZAJA *et al.* 2001), doença hepática gordurosa não alcoólica (LORIA *et al.*, 2003) e esquistossomose mansoni (PEREIRA *et al.*, 1997). Estas variáveis podem ter tido influência na baixa prevalência de auto-anticorpos encontrada em Cavunge. Muito embora o povoado sofra de condições de saneamento básico precárias e alta prevalência de marcadores de infecção pregressa por vírus da hepatite A (TAVARES-NETO *et al.* 2003; ALMEIDA *et al.* 2006), o mesmo apresenta frequência desprezível de infecção por hepatite C e

não se localiza em zona reconhecidamente endêmica para esquistossomose (TAVARES-NETO *et al.* 2003; ALMEIDA *et al.* 2006).

A frequência de SMA em indivíduos saudáveis foi de 1,5% a 43%, tendo os dois estudos populacionais prevalência inferior ou semelhante a encontrada no presente estudo (HOOPER *et al.* 1972; NJEMINI *et al.* 2002). Análise dos padrões de fluorescência do SMA revelou presença do padrão vaso e glomérulo em, respectivamente 80% e 20%, dos portadores de SMA e ausência do padrão túbulo. Estes padrões de fluorescência são de fundamental importância no diagnóstico de HAI-1 (VERGANI *et al.*, 2004), uma vez que o padrão túbulo tem maior especificidade para o diagnóstico da HAI-1 e se correlaciona com positividade para anticorpo anti-microfilamento, enquanto que o padrão vaso e glomérulo é mais frequentemente encontrado na população normal e em indivíduos com outras doenças hepáticas e sistêmicas (CZAJA *et al.*, 2001; VERGANI *et al.*, 2004). Os nossos resultados corroboram com estes achados, uma vez que não foi evidenciada positividade para o SMA-T. Por outro lado, a reatividade para o anticorpo anti-microfilamento foi encontrada em baixos títulos (1:20) em apenas um indivíduo com SMA, contrastando com os relatos de positividade para este auto-anticorpo na HAI-1 de 70%-80% (CZAJA *et al.*, 2001; VERGANI *et al.*, 2004, CANÇADO 1989; CANÇADO *et al.*, 1996, CANÇADO *et al.*, 2001).

A frequência de ANA em indivíduos saudáveis foi de 1,6% a 31,7%, tendo sido novamente observada prevalência inferior ou semelhante a descrita no presente estudo naqueles dois estudos populacionais (HOOPER *et al.* 1972; NJEMINI *et al.* 2002). O principal padrão de reatividade para o ANA observado

em nosso trabalho foi o nuclear pontilhado grosso, observado em 83% das amostras positivas para ANA, tendo sido observado também os padrões nucleolar homogêneo, citoplásmico fibrilar e nuclear homogêneo. Muitos estudos vêm mostrando que os padrões de reatividade do ANA apresentam relevância clínica (LESER *et al.*, 2004, WATANABE *et al.*, 2004, GOTO *et al.*, 2006, LORA *et al.*, 2007, DELLAVANCE *et al.*, 2007), tendo sido os padrões nuclear pontilhado grosso e nuclear homogêneo associados à presença de enfermidades auto-imunes e os padrões nuclear pontilhado fino denso e nuclear pontilhado grosso reticulado associados predominantemente a indivíduos sem qualquer evidência de auto-imunidade (LESER *et al.*, 2004., LORA *et al.*, 2007, DELLAVANCE *et al.*, 2007). Outros padrões de fluorescência apresentaram graus de associação intermediária.

Apesar da maioria dos portadores de ANA no presente estudo apresentarem padrão nuclear pontilhado grosso, todos exibiram títulos baixos de 1:40 e apenas um indivíduo com padrão nucleolar exibiu títulos altos de 1:320. Por outro lado, embora a maioria dos portadores saudáveis de ANA apresente padrão pontilhado fino denso, vários outros padrões de maior especificidade para o diagnóstico de doença auto-imune já foram identificados em indivíduos saudáveis sem maior repercussão clínica (FERNANDEZ *et al.* 2003; WATANABE *et al.* 2004; HILARIO *et al.* 2004; LORA *et al.*, 2007, DELLAVANCE *et al.*, 2007)

A freqüência observada de AMA foi semelhante à relatada em outras casuísticas, demonstrando a baixa freqüência deste auto-anticorpo na população normal. Embora, o AMA possa ocorrer em indivíduos saudáveis e em raros casos de hepatite C (MATTALIA *et al.*, 1998; RAMOS-CASALS *et al.*, 2005), sua

presença é altamente indicativa de CBP ou de propensão para desenvolver a doença em regiões de alta prevalência de CBP (METCALF *et al.* 1996). O anticorpo anti-M2 está presente na maioria dos pacientes com CBP e pode se encontrar positivo em cerca de 10% dos casos da doença nos quais o AMA é indetectável por IFI (MATTALIA *et al.*, 1998 ou METCALF *et al.* 1996). É importante ressaltar que o único caso de positividade para o AMA no presente estudo não se correlacionou com reatividade para o anti-M2 por immunoblotting.

Não foi evidenciada reatividade para anti-LKM1 e anti-LC1 na amostra da população de Cavunge estudada, ratificando dados da literatura que descrevem reatividade destes auto-anticorpos restrita a pacientes com HAI e alguns indivíduos com auto-imunidade associada a infecção por vírus C (CZAJA *et al.*, 1994b, BORTOLOTTI *et al.*, 1996; GIOSTRA *et al.*, 1996; LENZI *et al.*, 1999, CZAJA *et al.*, 2001).

A comparação da freqüência dos auto-anticorpos com as variáveis demográficas no presente estudo revelou maior freqüência de auto-anticorpos, SMA e ANA em indivíduos do sexo feminino. Predisposição do sexo feminino para expressão de SMA e ANA em indivíduos saudáveis também foi observada em alguns (NJEMINI *et al.*, 2002; AL JABRI *et al.* 2003), mas não em todos (WHITEHOUSE & HOLBOROW, 1971) os estudos. É interessante ressaltar que nos dois estudos de base populacional, maior freqüência de ANA mas não de SMA (HOOPER *et al.*, 1972) e de SMA mas não de ANA (NJEMINI *et al.*, 2002) foram relatados em indivíduos do sexo feminino.

No presente estudo não houve diferença nas freqüências de auto-anticorpos, SMA e ANA em crianças e adultos, mas indivíduos com auto-

anticorpos positivos exibiram idade significativamente maior, quando comparados com indivíduos sem auto-anticorpos. Vários estudos, mas não todos (AL JABRI *et al.*, 2003) encontraram correlação entre SMA (HOOPER *et al.* 1972; WHITEHOUSE & HOLBOROW, 1971) e idade mais avançada. Por outro lado, alguns estudos associaram ANA com idade mais avançada (ANDERSEN, 1977; AL JABRI & RICHENS, 2001; AL JABRI *et al.*, 2003), fato também não identificado em todas as séries analisadas. Hooper *et al.* (1972) relacionaram ANA, mas não SMA com idade mais avançada, enquanto que Njemini *et al.* (2002) investigou apenas pacientes com idade superior a 60 anos.

A frequência de ANA em crianças foi avaliada em oito estudos (Tabela 10), encontrando prevalência de 0,8% a 22% (ARROYANE *et al.*, 1988; PETTY *et al.*, 1973; MARTINI *et al.*, 1989; CABRAL *et al.*, 1992; FORSLID *et al.*, 1994; KASAPÇOPUR *et al.*, 1999; HILÁRIO *et al.*, 2004; WANANUKUL *et al.*, 2005). Não houve associação entre positividade para ANA e sexo feminino em crianças em nenhum estudo e apenas um trabalho descreveu correlação entre idade mais avançada e ANA na faixa etária pediátrica (MARTINI *et al.*, 1989).

Não foi encontrado no presente estudo maior predisposição a ocorrência de auto-anticorpos na sede do município, quando comparada com zona rural. Nenhum estudo prévio realizou este tipo de comparação, mas é importante ressaltar que os outros estudos (HOOPER *et al.* 1972; NJEMINI *et al.* 2002) realizados em população rural foram aqueles que apresentaram resultados semelhantes àqueles encontrados na presente casuística.

Embora os dados não sejam uniformes, a ocorrência de ANA foi mais freqüentemente relacionada ao sexo feminino e a idade mais avançada,

sugerindo que sua expressão pudesse ser modulada por fatores intrínsecos, tais como envelhecimento ou maior predisposição feminina para produção de anticorpos, enquanto que a expressão do SMA fosse mais relacionada a fatores extrínsecos, tais como infecções (HOOPER *et al.* 1972). Estes achados nos levaram a avaliar a influência da infecção por vírus hepatotrópicos na expressão de ANA e SMA.

Almeida *et al.* (2006) haviam previamente realizado estudo sobre a prevalência de marcadores atuais e pregressos de infecção por HAV, HBV e HCV na população de Cavunge/BA. Os autores encontraram alta prevalência (83.3%) de infecção por HAV, semelhante àquela observada em áreas com baixo índice de desenvolvimento sócio-econômico (VITRAL *et al.*, 1991; CLEMENS *et al.*, 2000). Por outro lado encontraram freqüência desprezível de portadores das hepatites B (2.6%) e C (0,4%) na região, provavelmente devido ao baixo influxo migratório característico da zona rural do nordeste brasileiro.

Não foi encontrada no presente estudo correlação entre infecção pregressa ou ativa por vírus hepatotrópicos e auto-anticorpos. Apesar do alto número de indivíduos positivos para IgG anti-HAV na população de Cavunge, não foi observada correlação entre infecção pregressa isolada por vírus A e auto-anticorpos circulantes. A freqüência de auto-anticorpos em portadores de hepatites B e C varia na literatura médica de 2% a 66%, habitualmente em baixos títulos (CZAJA *et al.*, 1992; CZAJA *et al.*, 1993; FRIED *et al.*, 1993; REDDY *et al.*, 1993; CLIFFORD *et al.*, 1995; BORTOLOTTI *et al.*, 1996). A ausência de correlação entre auto-anticorpos e infecção viral observada no presente estudo pode refletir a baixa prevalência de hepatite B e C em Cavunge, mas não

corroborar com a tese de que a presença dos auto-anticorpos na população normal seja secundária a infecções virais.

Todos os indivíduos positivos com titulação $\geq 1:80$ nesse trabalho foram investigados para infecções virais e doenças auto-imunes, particularmente HAI e CBP. Hiperglobulinemia foi a alteração laboratorial mais freqüentemente observada nos indivíduos com SMA e/ou ANA. No entanto, como não houve determinação dos níveis das proteínas totais e frações nos indivíduos sem auto-anticorpos ou eletroforese de proteínas nos portadores de ANA e SMA, não foi possível determinar se estas alterações laboratoriais são uma característica da população de Cavunge ou se ocorrem preponderantemente em indivíduos com auto-anticorpos positivos devido a elevação de gamaglobulinas IgM ou IgG. É possível que a população de Cavunge devido as suas condições sócio-econômicas esteja mais propensa a desenvolver infecções parasitárias associadas com elevação de globulinas. Neste contexto, é importante ressaltar estudo recente sobre a prevalência de leishmaniose em Cavunge, que demonstrou que 21,4% dos seus moradores tinham anticorpos contra a *Leishmania chagasi* (ELISA), tendo sido capturados flebótomos (*Lutzomia longipalpis*) em várias localidades do povoado (Tavares-Neto *et al.*, dados submetidos para publicação).

Não foi encontrada nenhuma outra alteração clínica e laboratorial nos indivíduos com auto-anticorpos positivos, com exceção de discreta e isolada de elevação de AST em um indivíduo e hipoalbuminemia que provavelmente reflete desnutrição provavelmente decorrente das condições sócio-econômicas adversas dos moradores do povoado.

Apesar de não ter sido possível repetição de aminotransferases e exame físico do indivíduo com SMA-V e AST discretamente elevada, pode-se praticamente descartar a presença de HAI neste indivíduo pela magnitude de elevação da AST e padrão de reatividade do SMA. A ocorrência de CBP também não pode ser aventada no indivíduo com AMA positivo à IFI, pela ausência de colestase e negatividade para o anticorpo anti-M2. Diante desses dados, não foi identificado nenhum paciente com CBP e HAI na amostra estudada da população de Cavunge, corroborando dados de lista de transplante de fígado no país que demonstram a raridade dessas doenças como causa de falência hepática terminal no Brasil (FARIAS *et al.*, 2001)

Os resultados deste estudo mostram claramente a existência dos auto-anticorpos dentro de uma população de indivíduos saudáveis, habitualmente em títulos baixos. A frequência desses auto-anticorpos é maior no sexo feminino e não se correlaciona com infecção pregressa ou ativa por vírus hepatotrópicos, nem evidencia portadores de doenças auto-imunes. Usando os ANA, SMA e AMA como ferramenta para o rastreamento da HAI e CBP, não foi identificado nenhum caso de indivíduo portador da doença. Esses dados sugerem cautela no emprego desses marcadores para o diagnóstico de doença auto-imune: HAI, CBP ou qualquer outra enfermidade, considerando que auto-anticorpos em baixos títulos podem ocorrer em população saudável.

Tabela 9: Frequência do SMA em indivíduos saudáveis por imunofluorescência indireta em cortes de tecidos de roedores

Autor	Localidade	N	%	Título inicial	Características
Whitehouse & Holborow (1971)	Belmont (Sutton)	46	20%	1:10	indivíduos saudáveis (grupo controle)
Hooper <i>et al.</i> (1972)	Busselton (Austrália)	3492	1,5%	1:1	estudo populacional
Wassermann <i>et al.</i> (1975)	Estocolmo (Suécia)	75	15%	1:10	indivíduos saudáveis (grupo controle)
McMillan & Haire, (1975)	Belfast (Irlanda)	54	7%	1:10	doadores de sangue
Andersen (1977)	Aarhus (Dinamarca)	582	5,5%	1:10	doadores de sangue, funcionários do laboratório, estudantes de medicina e pacientes hospitalizados sem doenças hepáticas ou doenças infecciosas
Lenzi <i>et al.</i> (1999)	Polonha (Itália)	226	3%	1:40	indivíduos saudáveis sem AgHBs e anti-HCV (grupo-controle).
Al-Jabri & Richens (2001)	Muscat (Oman)	392	32%	1:20	doadores de sangue e mulheres grávidas
Njemini <i>et al.</i> (2002)	Kumba (Camarões)	152	9%	1:40	estudo de base populacional (idosos)
Teubner <i>et al.</i> (2002)	Leipzig (Alemanha)	111	43%	1:40	indivíduos saudáveis
Al-Jabri <i>et al.</i> (2003)	Muscat (Oman)	1537	11%	1:20	Indivíduos saudáveis

Tabela 10: Frequência de reatividade para ANA em crianças saudáveis

Autor	Localidade	n	%	Título inicial	Técnica	Características
Petty <i>et al.</i> (1973)	Michigan (EUA)	90	3%	1:8	IFI CR	crianças saudáveis.
Arroyave <i>et al.</i> (1988)	Chicargo (EUA)	241	2% 2%	1:5	IFI CR CEH	crianças saudáveis de 4 m - 16a.
Martini <i>et al.</i> (1989)	Itália	268	3%	1:20	IFI CR	crianças saudáveis 1 m-14 a.
Cabral <i>et al.</i> (1992)	Canadá	93	16%	1:20	IFI HEp-2	crianças com ausência de doença auto-imune e doença reumática inflamatória.
Forslid <i>et al.</i> (1994)	Estocolmo (Suécia)	219	7% 2%	1:40 1:10	IFI HEp-2 IFI CR	crianças de 1 m - 15 a
Kasapçopur <i>et al.</i> (1999)	Istambul (Turquia)	118	0,8%	1:40	IFI HEp-2	crianças saudáveis
Hilário <i>et al.</i> (2004)	São Paulo (Brasil)	214	12,6%	1:80	IFI HEp-2	estudantes de escolas públicas e privadas
Wananukul <i>et al.</i> (2005)	Bangkok (Tailândia)	207	15%	1:40	IFI HEp-2	crianças saudáveis de 7m-15a

IFI: imunofluorescência indireta; CR: cortes de roedores; HEp-2: células HEp-2; CEH: célula epitelial humana; a: anos; m: meses.

Tabela 11: Frequência de reatividade para ANA em adultos saudáveis.

Autor	Localidade	n	%	Título inicial	Técnica	Características
Hooper <i>et al.</i> (1972)	Busselton (Austrália)	3492	2%	1:1	IFI CR	estudo populacional
Wassermann <i>et al.</i> (1975)	Estocolmo (Suécia)	75	15%	1:10	IFI CR	indivíduos saudáveis (grupo-controle)
McMillan & Haire, (1975)	Belfast (Irlanda)	54	7%	1:10	IFI CR	doadores de sangue
Andersen (1977)	Aarhus (Dinamarca)	582	4,8%	1:10	IFI CR	doadores de sangue, funcionários do laboratório, estudantes de medicina e pacientes hospitalizados sem doenças hepáticas ou doenças infecciosas.
Fritzles <i>et al.</i> (1985)	Clagary (Canadá)	2.500	2,5%	1:20	IFI HEp-2	doadoras de sangue
Manoussakis <i>et al.</i> (1987)	Ioannina (Grécia)	64	31%	1:40	IFI HEp-2	idosos saudáveis
De Vlam <i>et al.</i> (1993)	Gent (Bélgica)	485	13%	1:40	IFI HEp-2	doadores de sangue
Forslid <i>et al.</i> (1994)	Estocolmo (Suécia)	290	7% 6%	1:40	IFI HEp-2 IFI CR	Indivíduos saudáveis
Tan <i>et al.</i> (1997)	América do Norte, Europa, Oceania e Japão	125	31,7%	1:40	IFI HEp-2	indivíduos saudáveis de painel de 15 laboratórios internacionais
Lenzi <i>et al.</i> (1999)	Polonha (Itália)	226	4%	1:40	IFI HEp-2	indivíduos saudáveis sem AgHBs e anti-HCV (grupo-controle)
Al-Jabri & Richens. (2001)	Muscat (Oman)	392	1,5%	1:20	IFI HEP-2 IFI CR	doadores de sangue e mulheres grávidas
Teubner <i>et al.</i> (2002).	Leipzig (Chemnitz)	111	25%	1:40	IFI CR IFI HEp-2	indivíduos saudáveis
Njemini <i>et al.</i> (2002)	Kumba (Camarões)	152	9%	1:40	IFI HEp-2 IFI CR	Idosos provenientes de zona rural
Al-Jabri <i>et al.</i> (2003).	Muscat (Oman)	1537	8%	1:20	IFI CR IFI HEp-2	indivíduos saudáveis
Fernandez <i>et al.</i> (2003)	São Paulo (Brasil)	500	22,6%	1:40	IFI HEp-2	doadores de sangue
Watanabe <i>et al.</i> (2004)	Nagoya (Japão)	597	20%	1:40	IFI HEp-2	profissionais da área de saúde

IFI: imunofluorescência indireta; CR: cortes de roedores; HEp-2: células HEp-2

Tabela 12: Frequência do AMA em indivíduos saudáveis segundo alguns dados da literatura.

Autor	Localidade	n	%	Título inicial	Técnica	Características
Wassermann <i>et al.</i> (1975)	Estocolmo (Suécia)	75	0%	1:10	IFI CR	estudo envolvendo 100 indivíduos com câncer de mama e 75 controles sem doença neoplásica. indivíduos saudáveis.
Mattalia <i>et al.</i> (1998)	Norte da Itália	1530	0,5%	1:500 1:500	ELISA e IB	indivíduos saudáveis.
Lenzi <i>et al.</i> (1999).	Norte da Itália	226	0%	1:40	IFI CR	indivíduos saudáveis sem AgHBs e anti-HCV (grupo-controle)
Teubner <i>et al.</i> (2002)	Leipzig (Alemanha)	111	1%	1:40	IFI CR	indivíduos saudáveis.
Al-Jabri <i>et al.</i> (2003)	Muscat (Oman)	1537	0,8%	1:20	IFI CR	Indivíduos saudáveis
Njemini <i>et al.</i> (2002)	Kumba (Camarões)	152	1%	1:40	IFI CR	estudo de base populacional (idosos)

IFI: imunofluorescência indireta; CR: cortes de roedores; HEp-2: células HEp-2

9. Conclusões

1. Quatorze por cento da amostragem estudada da população do povoado de Cavunge apresentou reatividade para auto-anticorpos.
2. Os auto-anticorpos marcados foram SMA (10%), ANA (4%), AMA (0,1%) e anticorpo anti-microfilamento (0,1%). Não foi observada reatividade para anti-LKM1 e anti-LC1 em nenhuma amostra avaliada.
3. Os padrões de fluorescência observados nos portadores de ANA foram: nuclear pontilhado grosso (n=27), nucleolar homogêneo (n=2), citoplasmático fibrilar (n=2) e nuclear homogêneo (n=1).
4. Indivíduos com auto-anticorpos positivos apresentaram idade significativamente maior e maior preponderância do sexo feminino quando comparados a aqueles sem reatividade para auto-anticorpos.
5. Nenhum indivíduo foi identificado com HAI ou CBP na amostragem estudada da população do povoado de Cavunge.
6. Auto-anticorpos podem estar presentes em baixos títulos em uma população normal, não necessariamente indicando uma doença auto-imune.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar o perfil dos auto-anticorpos circulantes em indivíduos que apresentaram titulação $\geq 1:40$ quanto ao isotipo de imunoglobulina.
- Correlacionar nesta população hipergamaglobulinemia com auto-anticorpos circulantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K.; LICHTMA A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Editora Elsevier, 2007.

ABUAF, N.; LUNEL F.; GIRAL P.; BOROTTO E.; LAPERCHE S.; POUPON R.; OPOLON P.; *et al.* Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. **J. Hepatol.**, v. 8, p. 359-364, 1993.

ABUAF, N., JOHANET, C., CHRETIEN, P., *et al.* Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. **Hepatology**; v.16, p.892-8, 1992.

AL-JABRI A. A, RICHENS E. R. Occurrence of autoantibodies within healthy Omani individuals. **Sultan Qaboos University Journal of Medical Sciences.**;v.1, p.13-19, 2001.

AL-JABRI, A. A.; AL BELUSH, M. S. Frequency and Levels of Autoantibodies in Healthy Adult Omanis. **Ann Saudi Med.**, v. 23 n.6, p.: 372-375, 2003.

ALMEIDA, D.; TAVARES-NETO, J.; VITVITSKI, L.; ALMEIDA, A.; MELLO, C.; SANTANA, D.; TATSCH, F.; PARANÁ R. Serological Markers of Hepatitis A, B and C Viruses in Rural Communities of the Semiarid Brazilian Northeast. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 5, p. 317-321, 2006.

ARROYAVE, C. M, MARY, J. G, KENT, C. R, MARGE, W.. The frequency of antinuclear antibody (ANA) in children by use of mouse kidney (MK) and human epithelial cells (HEp-2) as sub-strates. **J Allergy Clin Immunol.**;v. 82: p.741-4, 1988.

ALVAREZ, F.; BERG, P.A.; BIANCHI, F. B.; BIANCHI, L.; BURROUGHS, A.K.; CANCADO, E.L. *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. **J. Hepatol.**; v. 31, p. 929–938, 1999.

ALVAREZ, F.; BERNARD, O.; HOMBERG, J.C.; KREIBICH, G. Anti-liver–kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. **J. Exp. Med.**, v. 161, p.1231–1236, 1985.

AMARAL, S. M. C.; PACHECO, A. M.; MATOS, A. A.; Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos e monócitos. **Med. Int.**, v. 6, n. 3, 1999.

ANDERSEN, P. Correlation of smooth-muscle and nuclear antibodies in normal subjects. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 27, p. 74-77, 1977.

AVRAMEAS, S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to gnothi seauton', **Imunol. Today**, v. 12, n. 5, 1991.

AVRAMEAS, S.; TERNYNCK T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system, **Res. Immunol.**, v.146, p. 235-248, jul. 1995.

BACHVAROFF, R. J.; RAPAPORT, F.T. Active secretion of cystoskeletal and mechanochemical proteins in EBV- genome-positive human lymphocytes. **Transplant. Proc.** , v. 12, p. 205-208, 1980.

BARRETT S.; GOH J.; COUGHLAN B. *et al.* The natural course of hepatitis C virus infection after 22 years in a unique homogenous cohort: spontaneous viral clearance and chronic HCV infection. **Gut.**, v. 49, p. 423–430, 2001.

BERG, P.A.; DONIACH, D.; ROITT, I.M. Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes. **J. Exp. Med.**; v. 126, p. 277-290, 1967.

BITTENCOURT, P. L.; FARIAS, A. Q.; ABRANTES-LEMOS, C.P.; GONCALVES, L. L.; GONCALVES, P.L.; MAGALHÃES, E.P.; CARRILHO, F.J; LAUDANNA, A. A.; CANÇADO, E.L. Prevalence of immune disturbances and chronic liver disease in family members of patients with primary biliary cirrhosis. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 19, n. 8, p. 873-878, aug. 2004.

BITTENCOURT, P.L.; GOLDBERG, A. C; CANCADO, E.L.; PORTA, G.; CARRILHO, F.J.; FARIAS, A.Q.; PALACIOS, S.A.; CHIARELLA, J.M.; ABRANTES-LEMOS, C. P.; BAGGIO, V.L.; LAUDANNA, A.A.; KALIL, J. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 94, p.1906-1913,1999b.

BITTENCOURT, P. L. Associação dos antígenos HLA-DR e DQ com a hepatite autoimune tipos 1 e 2. Tese de doutorado, São Paulo, Faculdade de Medicina da USP, 1999a.

BOGDANOS, D.P.; BAUM, H.; VERGANI, D. Antimitochondrial and other autoantibodies. **Clin. Liver Dis.**, v. 7, p. 759-777, 2003.

BOGDANOS, D.P.; INVERNIZZI, P.; MACKAY, I. R.; VERGANI, D. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical Challenges. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 21, 2008.

BORTOLOTTI, F.; VAJRO, P.; BALLI, F.; GIACCHINO, R.; CRIVELLARO, C; BARBERA, C.; CATALETA, M.; MURATORI, L.; PONTISSO, P.; NEBBIA, G.; ZANCAN, L.; BERTOLINI, A.; ALBERTI, A.; BIANCHI, F. Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. **J. Hepatol.**, v. 25, p.614-620, 1996.

BOTTAZZO, G. F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; FAIRFAX, A.; SWANA, G.; DONIACH, D.; GROESCHEL-STEWART, U. Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. **J. Clin. Pathol.**; v. 29, p. 403-410, 1976.

BRETHERTON, L.; BROWN, C.; PEDERSEN, J.S.; TOH, B.H.; CLARKE, F.M.; MACKAY, I.R.; GUST, I.D. ELISA assay for IgG autoantibody to actin: comparison of chronic active hepatitis and acute viral hepatitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 51, p. 611-616, 1983.

BROOME, U.; OLSSON, R.; LOOF, L., et al. Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis. **Gut.**, v. 38, p. 610-615, 1996.

BULLOCK, J.Y.; BOOTH, R.J.; WILSON, J.D. TISSUE ANTIBODIES IN A HEALTHY NEW ZEALAND POPULATION. New Zeal. Med. J., v. 89, n. 627, p.11-13, jan. 1979.

CABRAL, D. A, PETTY, R. E, FUNG, M., MALLESON, P. N. Persistent anti-nuclear antibodies in children without identifiable inflammatory rheumatic or autoimmune disease. **Pediatrics**, v. 89, p. 441-4, 1992.

CACOUB P.; RENO C.; ROSENTHAL et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. **Medicine** (Baltimore) v. 79, p. 47-56, 2000.

CANÇADO, E. L. R., FARIAS, A. Q., BITTENCOURT, P.L.. Hepatite autoimune. In Silva LC. Hepatites agudas e crônicas. **Sarvier**, São Paulo, p. 278-295, 2003.

CANÇADO, E L R.; VILAS-BOAS, L. S.; ABRANTES-LEMOS, C. P.; FERREIRA, NOVO N.; PORTA, G; SILVA, L. C.; LAUDANNA, A .A. Heat Serum Inactivation as a Mandatory Procedure for Antiactin Antibody Detection in Cell Culture. **Hepatology**, v. 23, n. 5, 1996.

CANÇADO, E. L. R. **Anticorpos contra componentes do citoesqueleto na hepatite auto-imune.** Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade da USP, 1989.

CANÇADO, E.L.R.; ABRANTES-LEMOS, C.P.; VILAS-BOAS, L.S.; NOVO, N.F; CARRILHO, F.J.; LAUDANNA, A. A. Thermolabile and Calcium-dependent Serum Factor Interferes with Polymerized Actin, and Impairs Anti-actin Antibody Detection. **J. Autoimmun.**, v. 17, p. 223-228, 2001.

CANÇADO, E.R. Hepatite Auto-Imune. In: SILVA, L.C. **Hepatites Agudas e Crônicas.** São Paulo: Sarvier, 1995. p. 218-243.

CASSANI, F.; CATALETA, M.; VALENTINI, P., et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. **Hepatology**, v. 26, p. 561-566, 1997.

CHAI, S. K.; MANTOVANI, L.; KASAIAN, M. T; CASALI, P. Natural antibodies. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 347, p. 147-159, 1994.

CLEMENS, S.; FONSECA, J.; AZEVEDO, T., et al. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in four centers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 1-10, 2000.

CLIFFORD, B. D.; DONAHUE, D.; SMITH, L.; CABLE, E.; LUTTIG, B; MANNS, M; AND BONKOVSKY, H. L. High Prevalence of Serological Markers of Autoimmunity in Patients With Chronic Hepatitis C. **Hepatology**, v. 21, n. 03, p. 613-619, 1995.

CLIFFORD, B. D.; DONAHUE, D.; CABLE, L.S.E.; LUTTIG, B.; MANNS, M.; BONKOVSKY, H. L. High Prevalence of Serological Markers of Autoimmunity in Patients With Chronic Hepatitis C. **Hepatology**, v. 21, p. 613-619, mar. 1995.

CODES L.; JESUS R.S., et al. Frequency and implications of autoantibodies in acute viral hepatitis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 35, n. 5, p. 465-9, 2002.

CODONER-FRANCH, P.; BERNAD, O.; MAGGIORE, G.; ALAGILLE, D.; ALVAREZ, F. Clinical and immunological heterogeneity of anti-liver-kidney microsome antibody-positive autoimmune hepatitis in children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 9, n. 4, p. 436-440, nov. 1989.

COURVALIN, J.C.; WORMAN, H.J. Nuclear envelope protein autoantibodies in primary biliary cirrhosis. Review. **Semin. Liver Dis.**, v. 17, n.1, p.79-90, feb. 1997.

COUTINHO, A.; KAZATCHKINE, M. D. Avrameas S.. Natural autoantibodies. **Curr. Op. Immunol.**, v. 7, p. 812-818, 1995 .

CUNNINGHAM, A.L.; MACKAY, I. R; FRAZER, IH; BROWN, C; PEDERSEN, J. S.; TOH, ZAULI, D.; SCHRUMPF, E.; CRESPI, C.; CASSANI, F.; FAUSA, O., et al. Antibody to G-actin in different categories of alcoholic liver disease: quantification by an ELISA and significance for alcoholic cirrhosis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 34, p.158-164, 1985.

CURRIE, M. S. Immunosenescence. **Comprehensive Therapy**, v. 18, p. 26-34, 1992.

CZAJA, A. J. Autoantibodies. **Bailliere's Clin. Gastroenterol.**, v. 9, p. 723-744, 1995.

CZAJA, A. J. Autoimmune liver disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 293-299, 2005b.

CZAJA, A. J. Autoimmune hepatitis and viral infection. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 23, p. 547-566, 1994b.

CZAJA, A. J. Chronic active hepatitis: the challenge for a new nomenclature. **Ann. Int. Med.**, v. 119, p. 510-517, 1993.

CZAJA, A. J.; CARPENTER, H. A.; SANTRACH, P.J.; MOORE, S. B. Genetic predispositions for the immunological features of chronic active hepatitis. **Hepatology**, v. 18, p. 816-822, 1993b.

CZAJA, A. J.; CARPENTER, H. A.; SANTRACH, P. J ; MOORE, S. B. Immunologic features and HLA associations in chronic viral hepatitis. **Gastroenterology**, v. 108, p. 157-164, 1995a.

CZAJA, A. J.; CARPENTER, H. A.; SANTRACH, P. J ; MOORE, S. B. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1502-1507, 1993c.

CZAJA, A. J.; HOMBURGER, H. A. Autoantibodies in liver disease. **Gastroenterology**, v. 120, p. 239-249, 2001.

CZAJA, A. J.; MANNS, M. P.; HOMBURGER, H. A. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1290-1295, 1992.

CZAJA, A. J., FREESE, D. K. American Association for the Study of Liver Disease. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. **Hepatology**. v. 36 n. 2, p. 479-97, 2002.

DELLAVANCE, A.; ALEXANDRE JÚNIOR, G.; CINTRA, A. F. U.; XIMENES, A. C.; NUCCITELLI, B.; VON MÜHLEN, C.A.; BICHARA, C. D.; YANO, C. *et al.* I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEP-2, **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 3, p. 207-216, 2002.

DELLAVANCE, A.; GABRIEL, J. A.; CINTRA, A. F. U.; XIMENES, A.C.; NUCCITELLI, B.; TALIBERTI, BEN HUR; MOREIRA, C.; MÜHLEN, C. A V.; BICHARA, C. D.; SANTOS, C. H. R.; *et al.* II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEP-2 Cells Definitions for standardization of autoantibody testing against the nucleus (ANA HEP-2), nucleolus, cytoplasm and mitotic apparatus, as well as its clinical associations. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 43, n. 3, p. 129-140, maio/jun. 2003.

DELLAVANCE, A.; LESER, P.G.; ANDRADE, L.E.C. Critical Analysis of the Antinuclear Antibody Test as Tool in Clinical Practice. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n.4, p. 265-275, jul./ago, 2007.

DELLAVANCE A.; JÚNIOR A. G. ; NUCCITELLI B., *et al.* 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2, controle de qualidade e associações clínicas. **Rev Bras Reumatol.** v. 49, n. 2, p.89-109, 2009.

DE DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R. et al. Tissue fractionation studies. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver. **Tissue Biochem. J.**, v.60, p.604-10, 1955.

DE VLAM K., DE KEYSER G., VERBRUGGEN G., et al. Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. **Clin Exp Rheu.**;v. 11, p. 393-397, 1993.

DIAW, L.; MAGNAC, C.; KITSCH, O ; BUCKLE, M.; ALZARI, P.M.; DIGHIERO, G. Structural and Affinity Studies of IgM Polyreactive Natural Autoantibodies. **J. Immunol.**, v. 158, p. 968-976, 1997.

FAINBOIM, I.; VELASCO, M. C. C., MARCOS, C. Y., *et al.* Protracted, but Not Acute, Hepatitis A Virus Infection Is Strongly Associated With HLA-DRB1*1301, a Marker for Pediatric Autoimmune Hepatitis. **HEPATOLOGY**, v. 33, p. 1512-1517, 2001.

FARIAS, A. Q, BITTENCOURT, P. L, DEGUTTI, M. M., CANÇADO, A.Q. Análise dos vários tipos de indicação do transplante hepático. In. Gayotto LCC & Alves VAF. Doenças do fígado e vias biliares. **Editora Atheneu**, São Paulo, p. 1121-1150, 2001.

FARIAS, A. Q., GONÇALVES, L. L., BITTENCOURT, P. L., DE MELO, E. S., ABRANTES-LEMONS, C. P., PORTA, G., NAKHLE, M. C., CARRILHO, F. J., CANCADO, E. L. Applicability of the IAIHG scoring system to the diagnosis of antimitochondrial/anti-M2 seropositive variant form of autoimmune hepatitis. **J Gastroenterol Hepatol.** v. 21, n. 5, p. 887-93, 2006.

FERNANDEZ, S. A. V; LOBO, A. Z. C.; OLIVEIRA, Z. N. P. O.; FUKUMORI, L. M. I.; PERIGO, A. M.; RIVITTI, E. A. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 58, p. 315-319, 2003.

FLISIAK, R.; PELSZYNSKA, M.; PROKOPOWICZ, D.; ROGALSKA, M.; GRYGORUK, U. High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, p. 5706-5709, 2005.

FORSLID, J., HEIGL, Z., JONSSON, J., SCHEYNIUS, A.. The prevalence of antinuclear antibodies in healthy young persons and adults, comparing rat liver tissue sections with Hep-2 cells as antigen substrate. **Clin Exp Rheumatol.**;v.12, p.137-41, 1994.

FRIED, M. W.; DRAGUESKU, J. O.; SHINDO, M.; SIMPSON, L. H.; BANKS, S. M.; HOOFNAGLE, J. M.; DIBISCEGLIE, A. M. Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus related chronic hepatitis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 631-636, 1993.

FRITZLER, M. J, PAULS, J. D, KINSELLA, J. D, BOWEN, T. J. Antinuclear, anticytoplasmic, and anti-Sjogren's syndrome antigen A (SS-A/Ro) antibodies in female blood donors. **Clin Immunol Immunopathol.**; v. 36, p. 120-8, 1985.

FRITZLER, M. J.; RATTNER, J. B. Identification of newer auto-antibodies and their clinical relevance. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 38, no. 3, maio/jun. 1998.

FUSCONI, M.; CASSANI, F.; ZAULI, D.; LENZI, M.; BALLARDINI, G.; VOLTA, U.; BIANCHI, F. B. Anti-actin antibodies: a new test for an old problem? **J. Immunol. Meth.**, v. 130, n.1, p. 1-8, jun. 1990.

GABBIANI, G.; SCHMID, E.; WINTER, S.; CHAPONNIER, C.; CHASTONAY, C.; VANDEKERCKHOVE, J.; WEBER, K.; FRANKE, W. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alfa type actin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 298-302, 1981.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; LAMELIN, J. P.; VASSALLI, P.; MAJNO, G.; BOUVIER C.A.; CRUCHAUD, A.; LUSCHER, E.F. Human smooth muscle autoantibody. Its identification as antiactin antibody and a study of its binding to "nonmuscular" cells. **Am. J. Pathol.**, v. 72, p. 473- 488, 1973.

GIOSTRA, F.; MANZIN, A.; LENZI, M.; FRANCESCONI, R.; SOLFOROSI, L.; MANOTTI, P.; MURATORI L.; ZAULI D.; CLEMENTI, M.; BIACHI, F.B. Low hepatitis C viremia levels in patients with anti-liver/kidney microsomal antibody type 1 positive chronic hepatitis. **J. Hepatol.**, v. 25, n. 4, p. 433-438, oct. 1996.

GOLDBERG, A. C, BITTENCOURT, P. L, MOUGIN, B., CANCADO, E. L. R, PORTA, G., CARRILHO, F. J., KALIL, J. Analysis of HLA Haplotypes in Autoimmune Hepatitis Type 1: Identifying the Major Susceptibility Locus. **Human Immunology** 2001; v. 62, p. 165-169.

GOLDBERG, A. C, BITTENCOURT, P. L., OLIVEIRA, L. C., *et al.* Autoimmune hepatitis in Brazil: an overview. **Scand J Immunol.**;v. 66, p. 208-16, 2007.

GRABAR, P. Auto-antibodies and the physiological role of immunoglobulins. **Immunol. Today**, v. 4, p. 337, 1983.

GRABAR, P. Hypotesis. Auto-antibodies and immunological theories: na analytical review. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 4, p. 453-466, 1975.

GREGORIO, G. V.; PORTMANN, B.; REID, F.; DONALDSON, P. T.; DOHERTY, D. G.; MCCARTNEY, M.; MOWAT, A. P.; VERGANI, D.; MIELI-VERGANI, G. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. **Hepatology**, v. 25, p. 541-547, 1997.

GRUPPI, A.; PISTORESINI-PALENCIA, M. C.; ORDONEZ, P.; CERBAN, F.; VOTTERO- CIMA E. Enhancement of natural antibodies in mice immunized with exoantigens of pl 4.5 from *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, v. 42, p. 151-159, 1994.

HARDY, R. R. B-1 B Cell Development. **The Journal of Immunology**. May, v. 176, p. 2749–2754, 2006.

HENNES, E. M., ZENIYA, M., CZAJA, A. J., PARÉS, A., DALEKOS, G. N., KRAWITT EL, BITTENCOURT, P. L., PORTA, G., BOBERG, K. M., HOFER, H., BIANCHI, F. B., SHIBATA, M., SCHRAMM, C., EISENMANN DE TORRES, B., GALLE, P. R., MCFARLANE, I., DIENES, H.P., LOHSE, A.W. International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. **Hepatology**. Jul, v. 48, n. 1, p. 169-76, 2008.

HEATHCOTE, E. J. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. **Hepatology**, v. 31, p. 1005-13, 2000.

HOOFNAGLE, J. H. The Course and Outcome of Hepatitis C. In: National Institute of Health Consensus Development Conference Statement - Management of Hepatitis C, 2002.

HILÁRIO, M.O; LEN, C.A.; ROJA, S.C.; TERRERI, M. T.; ALMEIDA, G.; ANDRADE, L.E. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. **Clin. Pediatr.** v. 43, p. 637-642, 2004.

HOMBERG, J. C.; ABUAF, N.; BERNARD, O.; ISLAM, S.; ALVAREZ, F. ; KHALIL, S. H.; POUPON, R.; DARNIS, F.; LEVY, V. G.; GRIPPON, P.; OPOLON, P.; BERNUAU, J.; BENHAMOU, J. P.; ALAGILLE, D. Chronic active hepatitis associated with antiliver kidney microsome antibody type 1: a second type of “autoimmune” hepatitis. **Hepatology**, v. 7, p.1333-9, 1987.

HOOPER, B.; WHITTINGHAM, S.; MATHEWS, J. D. et al. Autoimmunity in a rural community. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 12, p. 79-87, 1972.

JOHNSON, G. D; HOLBOROW, E. J; GLYNN, L. E. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. **Lancet.**, v. 2, p. 878-879, 1965.

JOHNSON, P. J.; MCFARLANE, I. G. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. **Hepatology**, v. 18, p. 998–1005, 1993.

KAPLAN, M. M.; GERSHWIN, M. E. Primary Biliary Cirrhosis. **N. Engl. J. Med.**, v.353, n. 12, p.1261-1273, sep. 2005.

KASAPÇOPUR, O.; OZBAKIR, F. et al. Frequency of antinuclear antibodies and rheumatoid factor in healthy Turkish children. **Turk J. Pediatr.** Jan-Mar, v. 41 n. 1 p. 67-71, 1999.

KAZATKCHINE, M. D. Delineating physiological (natural) autoreactivity from pathological autoimmunity. **Vox Sang.**, v. 70, Suppl, p. 24-29, 1996.

KRAWITT, E. L. Autoimmune hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 897-903, 1996.

KRAWITT, E. L. Autoimmune hepatitis: Classification, heterogeneity, and treatment. **Am. J. Med.**, v. 96, p. 23S-26S, 1994.

KURKI, P.; LINDER, E.; MIETTINEN, A.; ALFTHAN, O.; HEIKKINEN, A.; PASTERNAK, A. Tissue antibodies in malignant and benign urogenital disease. **Int. J. Cancer**, v. 19, p. 332-336, 1977.

KURKI, P.; LINDER, E.; MIETTINEN, A.; ALFTHAN, O. Smooth muscle antibodies of actin and non-actin specificity. Clin. Immunol. **Immunopathology**, v. 9, p. 443-453, 1978.

LACROIX-DESMAZES, S.; KAVERI, S. V.; MOUTHON, L.; AYOUBA, A. MALANCHERE, E.; COUTINHO, A.; KAZATCHKINE, M.D.; Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. **J. Immunol. Meth.**, v. 216, p.117-137, 1998.

LAPIERRE, P.; HAJOU, O.; HOMBERG, J. C; ALVAREZ, F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v. 116, p. 643-649, 1999.

LENZI, M.; BELLENTANI, S.; SACCOCCIO, G.; MURATORI, P.; MASUTTI, F.; MURATORI, L.; ASSANI, F; BIANCHI, F. B.; TIRIBELLI, C. Prevalence of non-organ-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. **Gut**, v. 45, p. 435-441, 1999.

LEUNG, P. S.; COPPEL, R. L.; ANSARI, A.; MUNOZ, S.; GERSHWIN, M. E. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 17, p. 61-69, 1997.

LEUSCHNER, M.; DIETRICH, C. F.; YOU, T.; et al. Characterisation of patients with primary biliary cirrhosis responding to long term ursodeoxycholic acid treatment. **Gut**. v. 46, p.121-126, 2000.

LESER, P.G; DELLAVANCE, A.; BARBOSA, S.H, et al.: Distinctive features of antinuclear antibodies observed in health and in subjects with autoimmune rheumatic diseases. In: Conrad K, Bachmann MP, Chan EKL, Fritzler MJ, Humbel RL, Sack U, Shoenfeld Y, eds. (org.). From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. **Dresden: Pabst Science Publishers** pp. 493-510, 2004.

LINDMAN, K.; BIBERFELD, G.; FAGRAEUS, A.; NORBERG, R.; THORSTENSSON, R.; UTTER, G.; CARLSSON, L.; LUCA, J.; INDBERG, U. Anti-actin specificity of human smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 24, p. 266-272, 1976.

LORA, P. S.; LAURINO, C. C. F. C.; FREITAS, A. E.; BRENOL, J. C. T.; MONTECIELO, O.; XAVIER, R. M. Antinuclear Antibodies (ANA) Immunofluorescent Pattern's in HEp-2 Cells on Samples Positive for Anti-SSA/Ro. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n.1, p. 4-9, jan./fev, 2007.

LORIA, P.; LONARDO, A.; LEONARDI, F.; FONTANA, C.; et al. Non-organ-specific autoantibodies in nonalcoholic fatty liver disease: prevalence and correlates. **Dig Dis Sci.**, 48:2173-81, 2003.

LUNEL, F.; ABUAF, N.; FRANGEUL, L.; GRIPPON, P.; PERRIN, M.; LE COZ, Y.; VALLA, D., BOROTTO, E., YAMAMOTO AM, HURAUX JM, et al. Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 16, n. 3, p. 630-636, sep. 1992.

MACKAY, I. R.; WHITTINGHAM, S.; FIDA, S.; MYERS, M.; IKUNO, N.; GERSHWIN, M.E.; ROWLEY, M.J. The peculiar autoimmunity of primary biliary cirrhosis. **Immunol. Rev.**, v. 174, p. 226-237, 2000.

MADDREY, W. C. Subdivisions of idiopathic autoimmune chronic active hepatitis (editorial). **Hepatology**, v. 7, p. 1372-1375, 1987.

MANNS, M. P. Autoantibodies and antigens in liver diseases-updated. **J. Hepatol.**, v. 9, p. 272-280, 1989.

MANNS, M. P. Autoimmune diseases of the liver. **Clin. Lab. Med.**, v.12, n. 1, p. 25-40, mar. 1992.

MANNS, M. P. Cytoplasmic autoantigens in autoimmune hepatitis: molecular analysis and clinical relevance. **Sem. Liver Dis.**, v. 11, p. 205-214, 1991.

MANNS, M. P. Recent Advances in Autoimmuneliver Diseases. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**. Dez., v. 18(6): p. 575-7, 1995.

MANNS, M. ; GERKEN, G. ; KYRIATSOULIS, A. ; STARITZ, M. ; MEYER-ZUM-BUSCHENFELDE, K.H. Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis against a soluble liver antigen. **Lancet**, v. 1, p. 292-294, 1987.

MANNS, M. P.; GRIFFIN, K. J.; SULLIVAN, K. F.; JOHSON, E. F. LKM-1 Autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1370-1378, 1991b.

MARGARIGA, P. S. Produção de auto-anticorpos em pacientes portadores de hepatite viral C crônica. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, 2005.

MARTINI, E.; ABUAF, N.; CARVALLI F, DURAND, V.; JAHANET, C.; HOMBER, G. J. C. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. **Hepatology**, v. 8, p. 1662-1666, 1988.

MARTINI, A., LORINI, R., ZANABONI, D., EAVELLI, A., BURGIO, R. G. Frequency of autoantibodies in normal children. **Am J Dis Child.**; v.143, p. 493-6, 1989.

MARTINS, E. B.; CHAPMAN, R. W. Sclerosing cholangitis. **Curr. Opin. Gastroenter**, v. 11, p. 452-6; 1995.

MATTAGLIA, A.; QUARANTA, S.; LEUNG P. S.; *et al.* Characterization of antimitochondrial antibodies in health adults. **Hepatology**, v. 27 p. 656-61, 1998.

METCALF, J.V., MITCHISON HC, PALMER JM, JONES DE, BASSENDINE MF, JAMES O. F. Natural history of early primary biliary cirrhosis. **Lancet.**, 348:1399-402, 1996.

MCFARLANE, I. G. Autoimmune hepatitis: diagnostic criteria, subclassifications, and clinical features. **Clin. Liver Dis.**, v. 6, p. 317–333; 2002.

MCFARLANE, I. G. The relationship between autoimmune markers and different clinical syndromes in autoimmune hepatitis. **Gut.**;v. 42, p. 599–602. 1998.

MCMILLAN, S. A.; HAIRE, M. Smooth muscle antibody in patients with warts. **Clin. exp. Immunol.**v. 21, p. 339, 1975.

MEAD, G. M.; COWIN, P.; WHITEHOUSE, J. M. A. ANTITUBULIN Antibody in healthy adults and patients with infectious mononucleosis and its relationship to smooth muscle antibody (SMA). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 39, p. 328-336, 1980.

MEFFRE, E.; SCHAEFER, A.; WARDEMANN, H.; WILSON, P.; DAVIS, E.; NUSSENZWEIG, M. Surrogate Light Chain Expressing Human Peripheral B Cells Produce Self-reactive Antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 1, p. 145–150, jan. 2004.

MIESCHER, P.; FAUCONNET, M. Absorption of L. E. factor by isolated cell nuclei. **Experientia**, v. 10, p. 252-253, 1954.

MURATORI, L.; SZTUL, E.; MURATORI, P.; GAO, Y.; RIPALTI, A.; PONTI, C.; LENZI, M.; LANDINI, M.P.; BIANCHI, F. B. Distinct epitopes on

formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. **Hepatology**. v. 34, p. 494-501, 2001.

MURATORI, P.; CZAJA, A. J.; MURATORI, L.; PAPPAS, G.; MACCARIELLO, S.; CASSANI, F.; GRANITO, A.; FERRARI, R.; MANTOVANI, V.; LENZI, M.; BIANCHI, F. B. Genetic distinctions between autoimmune hepatitis in Italy and North America. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 12, p.1862-1866, 2005.

NJEMINI, R., MEYERS I, DEMANET C.,et al. The prevalence of autoantibodies in an elderly sub-Saharan African population **Clin Exp Immunol**; v. 127, p. 99–106, 2002.

PEDERSEN, J. S.; TOH, B. H.; MACKAY, I. R.; TAIT, B. D.; GUST, I. D.; KASTELAN, A.; HADZIC, N. Segregation of autoantibody to cytoskeletal filaments, actin and intermediate filaments with two types of chronic active hepatitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 48, p. 527-532, 1982.

PETTY, R. E.; CASSIDY, J.T.; SULLIVAN, D. B. Clinical correlates of an-tinuclear antibodies in juvenile rheumatoid arthritis. **J. Pediatr**. v. 83, p. 386-9, 1973.

PEREIRA LM, MCFARLANE BM, MASSAROLO P, SALEH MG, BRIDGER C, SPINELLI V, et al. Specific liver autoreactivity in schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;v. 91, p. 310-4, 1997.

POTOCKA-PLAZAK, K.; PITUCH-NOWOROLSKA, A.; KOCEMBA, J. Prevalence of autoantibodies in serum of healthy persons over 85 years of age. **Przegl. Lek.**, v. 52, n. 11, p. 544-546, 1995.

PRINCE, M.; CHETWYND, A.; NEWMANW, et al. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years. **Gastroenterology**. v. 123, p. 1044–1051, 2002.

RAMOS-CASALS, M.; PARES, A.; JARA, L. J.; SOLANS, R.; VIÑAS, O.; VAZQUEZ, P.; SANCHEZ-TAPIAS, J.M.; RODES, J.; FONT, J. for the HISPAMEC Study Group* Antimitochondrial antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: description of 18 cases and review of the Literature, **J. Viral Hep.**, v. 12, p. 648–654, 2005.

REDDY, K. R; KRAWITT, E. L.; RADICK, J.; CHASTENAY, B.; DE MEDINA, M., JEFFERS, L. J., PARKER, T., et al. Absence of LKM 1 antibody in hepatitis C viral infection in the United States [Abstract]. **Hepatology**, v.18, p. 173A, 1993.

RIZZETTO, M.; BIANCHI, F. B.; DONIACH, D. Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis. **Immunology**, v. 26, p. 589-601, 1974.

RIZZETO, M.; SWANA, G. T.; DONIACH, D. Microsomal antibodies in chronic active hepatitis and other disorder. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 15, p. 331-339, 1973.

SANTOS, L. M.; MOREIRA, K. E. C. S.; RODRIGUES, S. H.; ALAMADA FILHO, C. M.; RAMOS, L.R.; ANDRADE, L. E. C. Prevalencia e valor prognostico de anticorpos antinucleares em individuos isodos. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.37, p. 323-328, 1997.

SEIBOLD, F.; SLAMETSCHKA, D.; GREGOR, M.; WEBER, P. Neutrophil autoantibodies: a genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 107, n. 2, p. 586-589, aug. 1994.

SEEF, L. Natural History of Chronic Hepatitis C. In: National Institute of Health Consensus Development Conference Statement - Management of Hepatitis C, 2002.

SENECAL, J. L.; LCHIKI, S.; GIRARD, D. ; RAYMOND, Y. Autoantibodies to nuclear laminins and to intermediate filament proteins: natural, pathologic or pathogenic? **J. Rheumatol.**, v. 20, p. 211-219, 1993.

SMITH, M. G; WILLIAMS, R.; WALKER, G; RIZZETTO, M; DONIACH, D. Hepatic disorders associated with liver-kidney microsomal antibodies. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 80-84, 1974.

STECHEMESSER, E.; KLEIN, R.; BERG, P. A. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v. 18, p. 1-9, 1993.

STRASSBURG, C. P.; MANNIS, M. P. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. **Semin. Liver Dis.**, v. 22, n. 4, p. 339-352, 2002.

SZOSTECKI, C.; GULDNER, H.H.; WILL, H. Autoantibodies against "nuclear dots" in biliary cirrhosis. Review. **Semin. Liver Dis.**, v. 17, n. 1, p. 71-78, feb. 1997.

TAN, E. M.; FELTKAMP, T.E.; SMOLEN, J. S., et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. **Arth. Rheum.** v. 40, p. 1601-1611, 1997.

TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; QUEIROZ-ANDRADE, M.; OLIVEIRA, S. Caracterização Sócio-demográfica da População do Povoado de Cavunge, Bahia. **Rev. Baiana Saúde Publ.**, v. 27, p. 60-75, 2003.

TERJUNG, B.; HERZOG, V.; WORMAN, H. J.; GESTMANN, I.; BAUER, C.; SAUERBRUCH, T.; SPENGLER, U. Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. **Hepatology**, v. 28, p. 332-340, 1998.

TERNYNCH, T.; AVRAMEAS, S. Murine natural monoclonal autoantibodies. A study of their polyspecificities and their families and their affinities. **Immunol. Rev.**, v. 94, p.99-112, 1986.

TEUBNER, A.; TILLMANN, H.L.; SCHUPPAN, D.; GERICKE, G.; MANNS, M.P.; STÖLZEL, U. Prävalenz von zirkulierenden Autoantikörpern bei gesunden Individuen. **Med. Klin.**, v. 97, p. 645–649, 2002.

TODA, G.; ZENIYA, M.; WATANABE, F., et al. Present status of autoimmune hepatitis in Japan—correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. **J. Hepatol.**, v. 26, p. 1207– 1212, 1997.

TOH, B. H. Smooth muscle autoantibodies and autoantigens (review). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 38, p. 621-628, 1979.

TOMER, Y.; SHOENFELD, Y. The significance of natural autoantibodies. **Immunol. Investig.**, v. 17, p. 389-424, 1988.

TRENCH, P.; SNEYD, P.; HOLBOROW, E. J. Immunofluorescent tracing of smooth muscle contractile protein antigens in tissues other than smooth muscle. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 16, p. 125-136, 1974.

VAN DE WATER, J.; COOPER, A.; SURH, C. D.; et al. Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis. **New Engl. J. Med.**, v. 320, p. 1377-1380, 1989.

VERGANI, D.; ALVAREZ, F.; BIANCHI F.B.; CANÇADO, E.L.R.; MACKAY, I.R.; MANNS, M.P.; NISHIOKA, M.; PENNER, E. Liver auto immune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. **J. Hepatol.**, v. 41, p. 677-683, 2004.

VITRAL, C. L.; GASPAR, A. M. C.; YOSHIDA, C.F.T. Two competitive enzyme immunoassays for the detection of IgG class antibodies to hepatitis A antigen. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 24, p. 79-85, 1991.

WANANUKUL, S., VORAMETHKUL, W., et al. Prevalence of Positive Antinuclear Antibodies in Healthy Children. **ASIAN PACIFIC JOURNAL OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY**, v. 23: p. 153-157, 2005.

WARDEMANN, H., S.; YURASOV, A.; SCHAEFER J.W.; YOUNG E.; et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. **Science**, v. 301, p. 1374–1377, 2003.

WASHINGTON, M.K. Autoimmune liver disease: overlap and Outliers. **Mod. Pathol.**, v. 20, p. S15–S30, 2007.

WASSERMANN, J., GLAS, U. & BLOMGREN, H. Autoantibodies in patients with carcinoma of the breast. Correlation with prognosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 19, 417, 1975.

WATANABE, A.; KODERA, M.; SUGIURA, K.; USUDA, T.; TAN, E. M.; WATANABE, T. A.; KODERA, M.; SUGIURA, K.; USUDA, T.; TAN, E.M.; TAKASAKI, Y. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. **Arth. Rheum.**, v. 50, p. 892-900, 2004.

WHITEHOUSE, J. M. A.; HOLBOROW, E. J. Smooth muscle antibody in malignant disease. **Br. Med. J.**, v. 4, 5113, 1971.

WHITEHOUSE, J. M. A.; HOLBOROW, E.J. Smooth muscle antibody in malignant disease. **Brit. Med. J.**, v.4, p. 511, 1971.

YAMAMOTO, A. M.; JOHANET, C.; DUCLOS-VALLEE, J. C., BUSTARRET, F. A.; ALVAREZ, F.; HOMBERG, J.C.; BACH, J. F. A new approach to cytochrome CYP2D6 antibody detection in autoimmune hepatitis type-2 (AIH-2) and chronic hepatitis C virus (HCV) infection: a sensitive and quantitative radioligand assay. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 108, p. 396-400, 1997.

YAMAMOTO, A. M.; CRESTEIL, D.; BONIFACE, O.; CLERC, F.F.; ALVAREZ, F. Identification and analysis of cytochrome P-450IID6 anti-genic sites recognized by anti-liver kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p.1105-1011, 1993.

YEAMAN, S. J. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. **Biochem. J.**, v. 257, p. 625-632, 1989.

YEAMAN, S. J. Oxidative decarboxylation of 4-methylthio-2-oxobutyrate by branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex. **Trends Biochem. Sci.**, v. 11, p. 293-296, 1986.

ZACHOU, K.; RIGOPOULOU, E.; DALEKOS, G. N.. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. **J. Autoimm. Dis.**, v.1, n.2, 2004.

ZARIFE, M. A. S. Prevalência da Infecção pelo Vírus C da Hepatite (VHA) em Salvador-Bahia. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Patologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Salvador, 2002.

Anexo I

Anexo Ia

Sistema de pontuação proposto pelo Grupo Internacional de Estudo da Hepatite Autoimune para o diagnóstico da doença

Parâmetros / Características	Pontuação
Sexo feminino	+2
Elevação das enzimas hepáticas, FA/ALT ou AST	
< 1,5	+2
1,5 - 3,0	0
>3,0	-2
Globulinas séricas ou IgG acima do normal	
> 2,0	+3
1,5 - 2,0	+2
1,0 - 1,5	+1
< 1,0	0
ANA, SMA, AMAFR 1	
>1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
<1:40	0
AMA positivo	- 4
Marcadores de hepatites virais (A, B, C)	
Positivo	- 3
Negativo	+3
Uso de drogas hepatotóxicas	

Positivo	- 4
Negativo	+1
Uso de Álcool (consumo médio)	
< 25 g/dia	+2
> 60 g/dia	- 2
Histologia hepática	
Hepatite de interface	+3
Infiltrado linfoplasmocítico	+1
Rosetas em células hepáticas	+1
Nenhuma das acima	- 5
Alterações biliares	- 3
Outras alterações, sugestivo de outras patologias	- 3
Outras doenças autoimunes	+2
Parâmetros Adicionais	
Soropositividade para outros AA definidos	+2
HLA DR3 ou DR4	+1
Resposta à terapia - Completa	+2
(Em qualquer momento) - Recidiva	+3
<hr/>	
Critérios para diagnóstico definitivo de HAI	
Pré-tratamento: - HAI definida	>15
- HAI provável	10-15
Pós-tratamento: -HAI definida	>17
-HAI provável	12-17

Anexo Ib

Critérios Diagnósticos Simplificados propostos pelo Grupo Internacional de Estudo da Hepatite Autoimune para o diagnóstico da doença.

Variável	Cutoff	Pontuação
Auto-anticorpos		
ANA ou SMA	≥ 1:40	1
ANA ou SMA	≥ 1:80	
ou AMAFR 1	≥ 1:40	2*
ou AAHS	positivo	
IgG acima do normal		
	> 1	1
	> 1.1	2
Histologia hepática**		
	Compatível com HAI	1
	Típica de HAI	2
Ausência de hepatites virais	Sim	2
Critérios para diagnóstico definitivo de HAI		≥7
Critérios para diagnóstico provável de HAI		≥6

* Máximo de pontos atingíveis considerando todos os AA: 2 pontos

** Evidência de hepatite à histologia é condição obrigatória para pontuação.

Anexo II

Questionário de recoleta

Nome: _____ Sexo: 1 () masculino 2 () feminino

Data de Nascimento: _____ Idade: _____

Entrevistador: _____

Raça/Cor: _____ Altura: _____ Peso: _____ Estado civil: _____

Escolaridade: _____

Consumo de álcool:

() ausente () menor do que 20g/dia () maior que 20g/dia

Tem alguma co-morbidade: (especificar) _____

Usa algum medicamento: (especificar) _____

Tem ou já apresentou sintomas (sim=1; não=0)

() Colúria () Icterícia () Aumento de volume abdominal

() Sangramento digestivo () Encefalopatia Hepática () Fotossensibilidade

() Convulsões () Ulceras orais

() Artralgia (especificar): _____

() Artrite (especificar): _____

() Rash (especificar): _____

Antecedentes familiares:

() DCPF: _____

() Doenças auto-imunes: _____

consangüinidade

EF: (Sim=1 / Não=0)

Icterícia (grau): _____

Aranhas vasculares Eritrema palmar

Ginecomastia Baqueteamento digital Flapping

Aparelho respiratório (verificar propedêutica de derrame pleural):

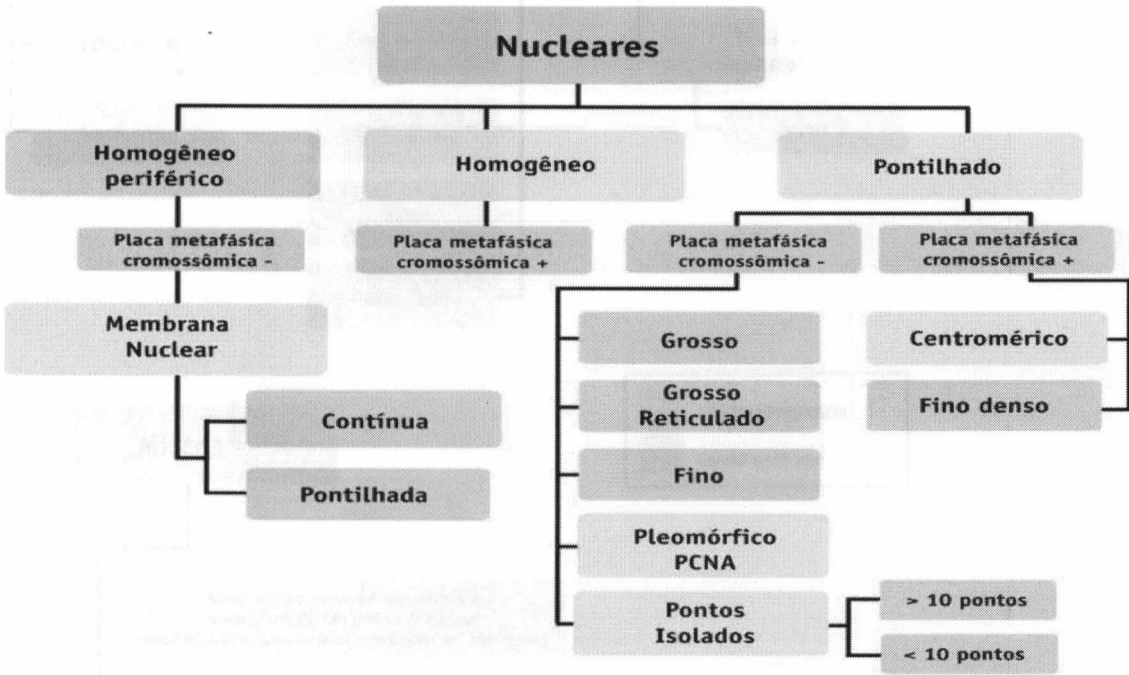
Abdomen: Hepatomegalia esplenomegalia ascite (leve/ moderada/
tensa): _____

Extremidades:

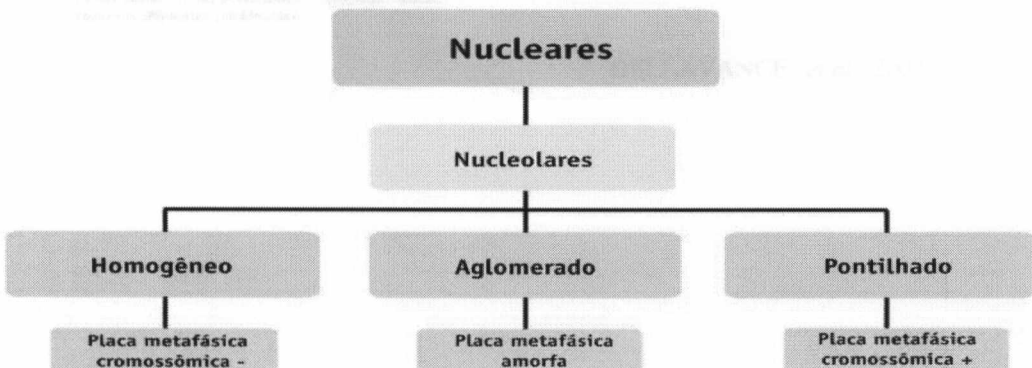
Artrite (especificar local e presença de deformidade):

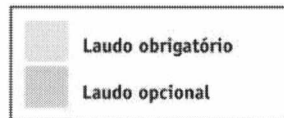
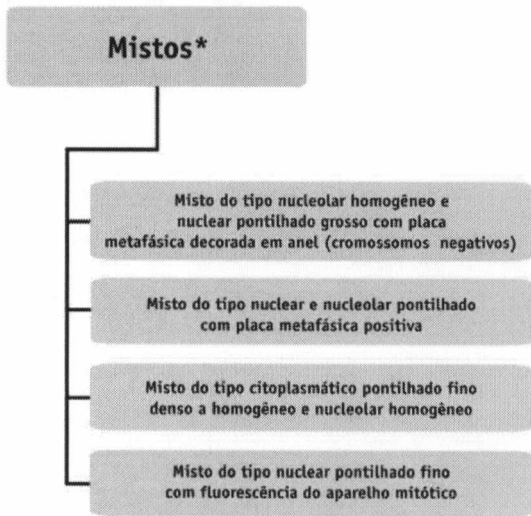
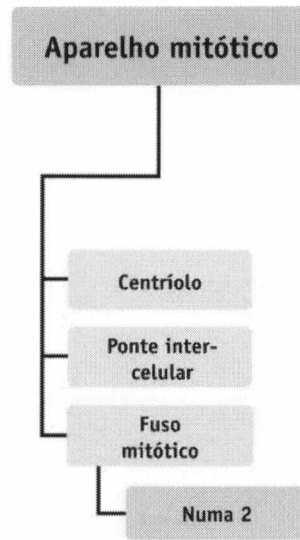
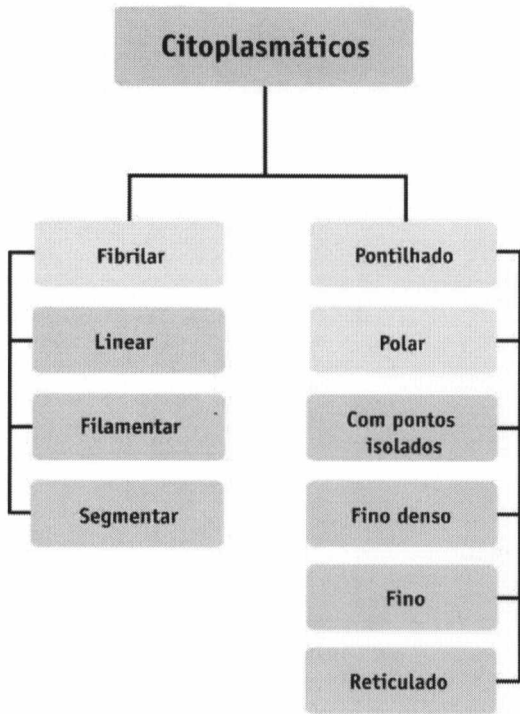
Anexo III

ALGORITMOS DE CLASSIFICAÇÃO DO II CONSENSO BRASILEIRO DE FAN HEP-2.



	Laudo obrigatório
	Laudo opcional
	Guia de interpretação





* Podem ocorrer outras possibilidades de padrões mistos, conforme diferentes combinações.

DELLAVANCE *et al.*, 2003.