

A análise morfométrica para avaliar a taxa de progressão da fibrose hepática na hepatite C crônica após o transplante renal: uma série de casos

Morphometric analysis to evaluate hepatic fibrosis progression rate in chronic hepatitis C after kidney transplantation: a case series study case series

LUCAS O. CANTADORI,¹ FERNANDO G. ROMEIRO,¹ FABIO S. YAMASHIRO,¹ CARLOS A. CARAMORI,¹ MARIA F. C. CARVALHO,¹ GIOVANNI F. SILVA¹

RESUMO

O verdadeiro papel do transplante renal na progressão da fibrose hepática causada pelo vírus da hepatite C ainda é imprevisível. A avaliação histológica do fígado é a melhor forma para estimar a evolução da fibrose, embora a análise semiquantitativa traz limitações importantes. **Objetivo:** Aplicar um ensaio morfométrico quantitativo sobre a progressão da fibrose hepática em pacientes renais crônicos com hepatite C. **Métodos:** Trinta pacientes foram inicialmente avaliados, mas apenas sete foram incluídos. Eles foram submetidos à primeira biópsia perto da data do transplante e a segunda biópsia, pelo menos, quatro anos mais tarde. A terapia imunossupressora adotada em todos os casos foi a azatioprina e micofenolato. A taxa de progressão da fibrose (FPR) foi calculada antes e após a data da cirurgia de cada paciente, de acordo com a classificação de Metavir pontuação e análise morfométrica. **Resultados:** A FPR calculada pelo escore Metavir não mostrou diferença estatística entre pré e pós-transplante ($p = 0,9$). A FPR calculada pela análise morfométrica foi de $0,58 \pm 0,78$ antes do transplante e $3,0 \pm 3,3$ após a cirurgia, com significância estatística entre estes valores ($p = 0,0026$). **Conclusão:** Na amostra avaliada, a progressão da fibrose hepática foi documentada e quantificada apenas pela análise morfométrica, que é uma abordagem promissora para avaliação histológica desses pacientes.

Unitermos: Hepatite C, Avaliação Histológica, Transplante Renal, Cirrose Hepática, Fibrose.

ABSTRACT

The real role of renal transplantation in hepatic fibrosis progression caused by hepatitis C virus is still unpredictable. Histological evaluation of the liver is the best form to estimate fibrosis evolution, although semiquantitative analysis carries important limitations. **Objective:** To apply a morphometric quantitative assay on hepatic fibrosis progression in renal recipients with hepatitis C. **Methods:** Thirty patients were initially evaluated, but only seven were included. They underwent the first biopsy near the transplantation date and the second biopsy at least 4 years later. The immunosuppressant therapy adopted in all cases was azathioprine and micofenolate. Fibrosis progression rate (FPR) was calculated before and after the surgery date in each patient according to Metavir score and morphometric analysis. **Results:** The FPR calculated by Metavir score showed no statistical difference between pre- and post-transplantation ($p=0.9$). The FPR calculated by the morphometric analysis was 0.58 ± 0.78 before transplantation and 3.0 ± 3.3 after the surgery, with statistical significance between these values ($p=0.0026$). **Conclusion:** In the sample assessed, the progression of hepatic fibrosis was documented and quantified only by the morphometric analysis, which is as a promising approach to histological evaluation of these patients.

Keywords: Hepatitis C, Histological Techniques, Kidney Transplantation, Liver Cirrhosis, Fibrosis.

1. Depto. de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu/ UNESP – Universidade Estadual Paulista. **Endereço de correspondência:** Fabio da Silva Yamashiro - Depto. de Clínica Médica – Distrito de Rubião Jr. s/n - CEP: 18618-970 – Botucatu – SP – Brasil - e-mail: fsyamashiro@fmb.unesp.br. **Recebido em:** 13/01/2013. **Aprovado em:** 20/02/2013.

INTRODUÇÃO

A doença renal crônica é um importante fator de risco para a transmissão do vírus da hepatite C (VHC), na qual observamos altas taxas de infecção viral nos pacientes transplantados de rim.^{8,11} Apesar de muitos estudos tentarem determinar o real impacto do transplante renal e da terapia imunossupressora na taxa de progressão da fibrose hepática (PFH) associada à infecção pelo vírus da hepatite C, este assunto ainda permanece sem resposta.^{1,3-11,13} Embora alguns investigadores mostrem elevada PFH entre estes pacientes, a questão ainda é um desafio porque os resultados são difíceis de reproduzir. As muitas diferenças entre as populações avaliadas nestes estudos podem explicar a discrepância encontrada. Outra causa de divergência em relação aos achados histológicos talvez se deva à heterogeneidade de opinião entre os patologistas em relação às classificações histológicas aplicáveis. A avaliação histológica permanece o melhor método para classificar a fibrose hepática em virtude de permitir o cálculo da PFH quando duas ou mais amostras são obtidas. Ela pode ser realizada por ensaios quantitativos, como na análise morfométrica, evitando as variações entre diferentes examinadores e permitindo uma maior precisão na quantificação da PFH. Até hoje não há estudos que tenham utilizado este método na análise de amostra histológica hepática obtida de receptores de rim. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a PFH causada pela hepatite C em pacientes sob terapia imunossupressora que foram submetidos ao transplante renal. Os resultados foram analisados semiquantitativamente (pontuação de METAVIR) e morfometricamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra foi composta por pacientes que apresentaram exame positivo para VHC-RNA, submetidos a transplante de rim recebendo terapia imunossupressora. Apenas os pacientes com duas biópsias em momentos diferentes foram selecionados. Pacientes que necessitaram de uma nova cirurgia para remover o rim transplantado, indivíduos infectados com hepatite B ou que tinham recebido tratamento prévio para hepatite C, e aqueles com amostras histológicas contendo menos de 5 espaços porta foram excluídos.

Uma vez que a infecção viral é atualmente considerada uma contraindicação para o transplante renal, o estudo é retrospectivo. Trinta pacientes foram inicialmente avaliados, mas apenas sete foram incluídos (cinco do sexo masculino, dois do sexo feminino). Todos os pacientes foram submetidos à biópsia hepática próxima ao transplante renal (entre 4 meses antes e imediatamente após a operação), e a segunda

biópsia, pelo menos, 4 anos mais tarde. A terapia imunossupressora adotada em todos os casos foi a azatioprina e micofenolato. Entre os 23 pacientes excluídos, 7 foram submetidos à remoção do rim transplantado no primeiro ano após a cirurgia, cinco não tinham tido nenhuma biópsia hepática até o início do estudo, cinco morreram antes da segunda biópsia e não tinham avaliação pós-morte, 2 apresentaram coinfeção com hepatite B, 2 haviam completado o tratamento da hepatite C e 1 tinha material insuficiente na biópsia hepática. O consentimento informado por escrito antes da participação no estudo foi obtido de acordo com a Declaração de Helsinque e com a aprovação do Comitê de Ética local.

Os profissionais envolvidos na análise dos dados foram cegados, em particular os que realizaram a avaliação histológica. O tempo pré-transplante de infecção foi definido como o tempo entre a via provável de contaminação e da primeira biópsia. A data provável da contaminação foi assumida como o ano da primeira transfusão, o início de hemodiálise ou quando o paciente tornou-se adicto de uma droga injetada. Todos os fatores de risco para a hepatite C foram considerados. Quando mais de um fator de risco for identificado, a via mais comum de transmissão viral foi avaliada como a causa da infecção (transfusão ou dependência de droga injetada).

A PFH pré-transplante foi determinada através dos estágios de fibrose (ou percentagem de fibrose em análise morfométrica) obtidos na primeira biópsia, dividido pelo tempo entre a infecção e a cirurgia (F1/TI). A PFH pós-transplante foi calculada como a diferença entre a fase de fibrose última (ou fibrose percentual) e da anterior, dividido pelo tempo entre as biópsias (F2 - F1/¶).

A idade quando a infecção ocorreu, o tempo de infecção, genótipo viral, quantitativa HCV RNA, a etiologia da doença renal e dados bioquímicos foram avaliados. Os dados bioquímicos foram obtidos antes e após o transplante em momentos com estreita proximidade das biópsias, e eram compostos de aspartato aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase (AST), gama-glutamil transpeptidase (GGT), bilirrubina e de eletroforese de proteínas (relação albumina/ globulina).

Quanto à avaliação histológica, as amostras obtidas foram fixadas em solução de formalina a 10% durante 48 horas e, em seguida, colocadas em álcool a 70% por mais 24 horas. Depois disso, o material foi incorporado em blocos de parafina que foram cortados em 0,4-0,5 secções µm. Todas as amostras foram coradas utilizando os mesmos procedimentos descritos para hematoxilina-eosina (HE), Masson e Sirius Picro Vermelho.

A análise semiquantitativa foi realizada por meio de avaliação do patologista usando as colorações de HE e Masson. A

gradação da fibrose foi feita conforme a classificação de METAVIR, na qual: 0 = ausência de fibrose; 1 = fibrose portal sem septos; 2 = expansão fibrose com alguns septos; 3 = septos numerosos sem nódulos; e 4 = cirrose.¹²

A análise quantitativa foi realizada pelo método morfométrico através da coloração de Picro Sirius Red. As duas amostras de cada paciente foram avaliadas cegamente pelo mesmo patologista, através do índice de densidade de fibrose, com base na razão entre a área ocupada pela fibrose e a área total do campo do microscópio. Usando uma câmera digital (Köhler CTV 500, sistema NTSC, com adaptação de lente de 0.63x) e um microscópio óptico (Leica DMLB, ocular LPlan 10x/25, objetivo lente PL Fluotar 20x / 0,50), essas áreas foram capturadas e digitalizadas.

A digitalização das imagens foi realizada no computador (AST Bravo T-MS PRO 6200, Pentium Pro, sistema Windows NT), no qual as áreas foram calculadas através do software Image Pro Plus™, versão 3.0 (Media Cybernetics LP, Silver Spring, EUA, 1997). Os campos microscópicos foram divididos em pixels com diferentes intensidades de luz e comprimentos de onda, permitindo a determinação das áreas de interesse.

O número máximo de campos aleatórios foi obtido em todas as amostras e cada campo de imagem de 640 x 480 pixels foi adquirido, equivalente a uma área de 148.148,14 µm² foi visualizada no microscópio em uma ampliação de 20 vezes.

A cor vermelha na coloração de Picro Sirius Red foi capturada pelo software e mudada para uma nova cor, aumentando assim o contraste entre as outras estruturas. A área desta nova cor foi então medida em µm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da pontuação METAVIR entre os diferentes momentos foi completada por um modelo linear generalizado para medidas repetidas. Erro multinomial e função de ligação cumulativa foram calculados para obter o valor p .

A comparação da análise morfométrica da fibrose entre os diferentes momentos também foi completada por um modelo linear generalizado para medidas repetidas. Erro binomial e função de ligação logística foram estimados para obter o valor p . A avaliação das taxas de progressão da fibrose obtidas por contagens METAVIR foi obtida por um modelo linear generalizado para medidas repetidas. Erro Gaussiano inverso e função de ligação potencial foram calculados para obter o valor p .

A avaliação das taxas de progressão da fibrose obtidas por análise morfométrica foi conseguida por um modelo linear generalizado para medidas repetidas. Erro binomial e função de ligação logística foram estimados para obter o valor p . O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A mediana do tempo, a partir do momento estimado de infecção até a primeira biópsia, foi de 15,28 anos e a mediana do tempo entre as biópsias foi 4,71 anos.

A tabela 1 ilustra os dados epidemiológicos e virológicos de cada sujeito. A tabela 2 resume os resultados de exames laboratoriais, enquanto a tabela 3 mostra os resultados obtidos a partir da análise histopatológica das biópsias.

Apenas um paciente não apresentou progressão da fibrose hepática pela classificação de METAVIR semiquantitativa. Todos outros sujeitos apresentaram algum grau de progressão histológica até a segunda biópsia. No entanto, a abordagem quantitativa por análise morfométrica mostrou progressão da fibrose em todas as amostras. A PFH calculada pela análise morfométrica foi de $0,58 \pm 0,78$ antes do transplante e $3,0 \pm 3,3$ após a cirurgia, com significância estatística entre estes valores ($p = 0,0026$). A PFH calculada pelo escore METAVIR não mostrou diferença estatística entre pré e pós-transplante ($p = 0,9$).

Tabela 1: Epidemiológicos e genotipagem do HCV dos pacientes. GN Glomerulonefrite = * = Tempo de infecção antes de transplante renal (anos). † = idade estimada da infecção de acordo com o fator de risco identificado (anos).

| Sujeitos | Fatores de risco | Tempo de infecção † | Idade da infecção | Etiologia da insuficiência renal | HCV genótipo |
|----------|------------------|---------------------|-------------------|----------------------------------|--------------|
| 1 | Hemodiálise | 14 | 27 | GN rapidamente progressiva | 3a |
| 2 | Hemodiálise | 16 | 32 | Síndrome de Alport | 3a |
| 3 | Hemodiálise | 12 | 40 | Hipertensão | 1b |
| 4 | Transusão | 19 | 40 | Hipertensão | 1b |
| 5 | Transusão | 14 | 23 | GN rapidamente progressiva | 1b |
| 6 | Transusão | 15 | 41 | Nefropatia diabética | 1b |
| 7 | Drogadição | 17 | 25 | GN Membranosa | 1b |

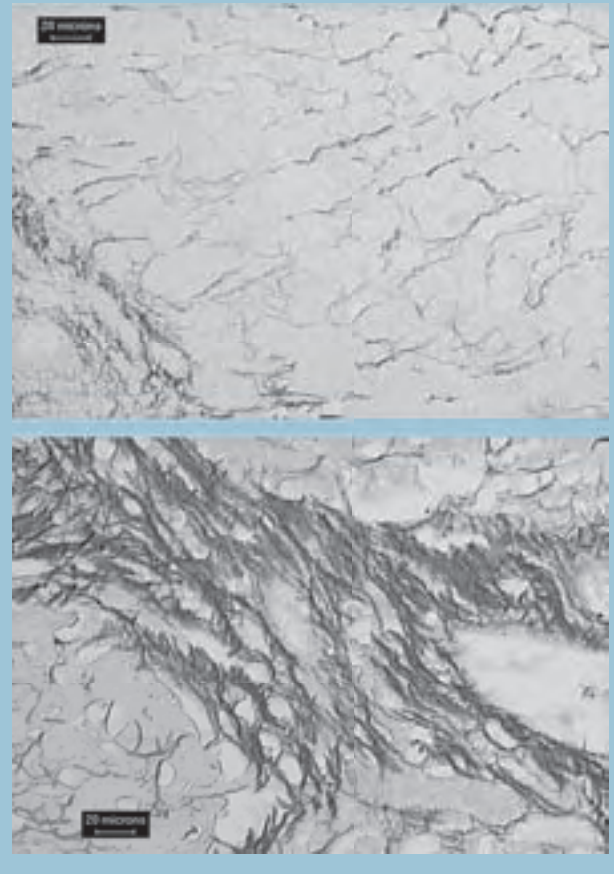
Tabela 2: Os exames laboratoriais realizados antes e após o transplante (primeira =/ segunda biópsias). ALT = alanina aminotransferase. AST aspartato aminotransferase =. GGT = gama-glutamil transpeptidase. A / G = relação albumina/globulina. ALT, AST e GGT, bilirrubinas são expressos em relação ao limite superior normal. Todos os dados são apresentados como pré/pós-transplante, com um tempo médio de cinco anos entre os exames pré e pós-cirurgia.

| Sujeitos | ALT | AST | GGT | Bilirrubina Total | A/G |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|
| 1 | 0,44 / 1,44 | 0,44 / 6,72 | 0,65 / 2,09 | 0,9 / 0,6 | 1,55 / 1,03 |
| 2 | 0,46 / 0,28 | 0,33 / 0,5 | 0,65 / 0,79 | 1,69 / 2,04 | 1,46 / 0,71 |
| 3 | 0,04 / 0,61 | 0,08 / 0,42 | 0,16 / 1,36 | 1,4 / 1,4 | 1,43 / 1,34 |
| 4 | 0,15 / 1,07 | 0,13 / 1 | 0,16 / 2,18 | 0,6 / 0,5 | 1,08 / 1,36 |
| 5 | 0,28 / 0,62 | 0,25 / 0,45 | 0,27 / 0,6 | 1,1 / 0,7 | 2,02 / 1,2 |
| 6 | 0,2 / 0,68 | 0,25 / 0,61 | 0,41 / 8,21 | 1 / 4 | 1,26 / 0,92 |
| 7 | 1,53 / 0,77 | 0,33 / 0,47 | 0,41 / 1,26 | 0,7 / 0,4 | 1,72 / 1,09 |

Tabela 3: Classificação histopatológica das biópsias hepáticas antes e após o transplante. MS = estadiamento METAVIR, que são expressos como fibrose (F) e da atividade inflamatória (A). MA = análise morfométrica utilizada para a quantificação de fibrose. 1 = transplante renal antes do transplante e 2 = após o transplante. A média de tempo entre as biópsias foi 4,71 anos.

| Sujeitos | MS 1 | MS 2 | MA 1 | MA 2 |
|----------|------|------|---------|---------|
| 1 | F1A0 | F2A1 | 0,34 % | 28,74 % |
| 2 | F4A3 | F4A1 | 35,57 % | 46,5 % |
| 3 | F1A1 | F2A1 | 3,04 % | 3,2 % |
| 4 | F0A0 | F1A1 | 1,34 % | 1,79 % |
| 5 | F2A1 | F2A1 | 5,11 % | 13,23 % |
| 6 | F4A1 | F3A1 | 13,38 % | 50,32 % |
| 7 | F0A0 | F2A0 | 4,75 % | 14,3 % |

Figura. 1: As biópsias do mesmo paciente antes (em cima) e após (embaixo) o transplante renal. Ambos os espécimes foram corados pelo Picro Sirius Red para identificar a progressão da fibrose.



DISCUSSÃO

O tratamento de VHC em pacientes após o transplante de rim não é rotineiramente recomendado devido a preocupações com o uso de interferon poder precipitar rejeição aguda; mas as cargas virais aumentam por volta de 1,0 a 1,5 log₁₀ UI ml⁻¹ após o transplante.¹⁴ Além disso, alanina aminotransferase aumenta em receptores de transplante de rim com os testes previamente normais e sobe ainda mais em pessoas com preexistentes elevações de ALT.¹⁴ A presença destas alterações e o risco de progressão da fibrose hepática merecem grande atenção nestes pacientes.

Há muitos estudos sobre os fatores de risco envolvidos na progressão da fibrose hepática em associação com a hepatite C em receptores de rim sob terapia imunossupressora,¹⁵ mas o estudo é o primeiro a empregar a análise morfométrica para quantificar a progressão da fibrose hepática com essa configuração. Até hoje, apenas um trabalho envolvendo pacientes com este perfil foi realizado, mas os resultados encontrados

foram heterogêneos, mostrando grande variação nas taxas de progressão de fibrose e até mesmo na regressão da fibrose anterior na mesma população.⁶

A vantagem da análise morfométrica é que ela permite uma análise histopatológica mais precisa evitando assim variações intra e interobservadores. Além disso, alguns estudos utilizando métodos semiquantitativos para avaliar a progressão da fibrose são forçados a dividir em grandes categorias em razão dos modelos aplicados até ao momento, sendo esta uma abordagem que pode gerar certa imprecisão na avaliação da PFH. Em um estudo anterior, a comparação entre estes métodos mostrou grande variação na análise da fibrose quando avaliada por morfometria na mesma classificação em relação ao escore semiquantitativo, em particular quando a cirrose está presente.⁸

Em nosso estudo, a análise morfométrica mostrou progressão da fibrose em todos os pacientes, incluindo o único sujeito em que a classificação METAVIR mostrou regressão da fibrose.

A hipótese de que a classificação METAVIR é por vezes subjetiva, o que parece uma explicação adequada para este caso, mas ela deve ser confirmada em novos estudos com mais pacientes. No entanto, uma limitação para estudos prospectivos é a redução do número de receptores de transplante renal com hepatite C porque estes devem ser tratados antes do transplante. De acordo com avaliações anteriores e os resultados obtidos neste estudo piloto, a variação entre as amostras da biópsia hepática e a variação de análise por patologistas diferentes parecem não ser as únicas razões para os resultados diferentes na literatura sobre a progressão da fibrose hepática nesta população.^{6,8}

Para fortalecer as observações histológicas de progressão da fibrose, observou-se ainda sinais bioquímicos compatíveis com lesões hepáticas ativas. Nossa amostra é muito pequena para avaliações estatísticas, mas todos os pacientes tinham elevadas as taxas de AST e cinco deles (71%) tinham valores elevados de ALT após o transplante de rim. Apenas um sujeito não demonstrou redução da relação albumina/ globulina, enquanto dois pacientes com fibrose hepática avançada apresentaram um aumento da bilirrubina total. Em conjunto, estes resultados podem sugerir uma lesão hepática significativa nos receptores de rim que foram avaliados.

Em conclusão, nossos resultados indicam uma progressão quantificável de fibrose hepática em pacientes com hepatite C que foram submetidos a transplante de rim e estão sob terapia imunossupressora. A avaliação histológica por análise

morfométrica se revelou uma abordagem promissora para evitar interpretações equivocadas de progressão de fibrose por ensaios semiquantitativos em receptores de transplante de rim.

REFERÊNCIAS

1. Alric L, Di-Martino V, Selves J, Cacoub P, Charlotte F, Reynaud D et al. Long-term impact of renal transplantation on liver fibrosis during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2002; 123:1494-1499.
2. Becker VR, Badiani RG, Lemos LB, Perez RM, Medina-Pestana JO, Lanzoni VP et al. Factors associated with the progression of hepatic fibrosis in end-stage kidney disease patients with hepatitis C virus infection. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2009; 21: 1395-1399.
3. Domínguez-Gil B, Morales JM. Transplantation in the patient with hepatitis C. *Transpl Int* 2009; 22: 1117-1131.
4. Fabrizi F, Martin P, Ponticelli C. Hepatitis C virus infection and renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 919-934.
5. Giordano HM, França AV, Meirelles L, Escanhoela CA, Nishimura NF, Santos RL et al. Chronic liver disease in kidney recipients with hepatitis C virus infection. *Clin Transplant* 2003; 17: 195-199.
6. Kamar N, Rostaing L, Selves J, Sandres-Saune K, Alric L, Durand D et al. Natural History of Hepatitis C Virus-Related Liver Fibrosis After Renal Transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1704-1712.
7. Mahmoud IM, Elhabashi AF, Elsayy E, El-Husseini AA, Sheha GE, Sobh MA. The impact of hepatitis C virus viremia on renal graft and patient survival: a 9-year prospective study. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 131-139.
8. Martin P, Fabrizi F. Hepatitis C virus and kidney disease. *J Hepatol*. 2008; 49: 613-624.
9. Minz M, Sharma A, Das A, Chawla Y. Impact of anti-hepatitis C virus (HCV) antibody on outcomes in renal transplant recipients infected with HCV. *Transplant Proc* 2008; 40: 2386-2388.
10. Morales JM, Campistol JM, Domínguez-Gil B. Hepatitis C virus infection and kidney transplantation. *Semin Nephrol*. 2002; 22: 365-374.
11. Perez RM, Ferreira AS, Silva IS, Medina-Pestana JO, Lanzoni VP, Silva AE et al. Hepatitis C virus infection in renal transplant patients: a comparative study with immunocompetent patients. *Clin Transplant* 2005; 19: 763-768.
12. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997; 349: 825-832.
13. Schiavon LL, Carvalho-Filho RJ, Narciso-Schiavon JL, Pinheiro SR, Barbosa DV, Lanzoni VP et al. Prediction of significant liver fibrosis in kidney transplant patients with chronic hepatitis C virus infection: the TX-3 index. *Journal of Viral Hepatitis*, 2010, 17: 391-399.
14. Terrault NA and Adey DB. The Kidney Transplant Recipient with Hepatitis C Infection: Pre- and Posttransplantation Treatment. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 563-575.
15. Zaitoun AM, Al Mardini H, Awad S, Ukabam S, Makadisi S, Record CO. Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol* 2001; 54: 461-465.
16. Zylberberg H, Nalpas B, Carnot F, Skhiri H, Fontaine H, Legendre C et al. Severe evolution of chronic hepatitis C in renal transplantation: a case control study. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:129-133.