

Concentração sérica de procolágeno amino-terminal tipo III como marcador de fibrose hepática em lactentes com hepatopatia crônica

Carmem M.V. Santos¹, Susana Luft¹, Jarbas R. de Oliveira¹,
Carlos T. Cerski¹, Aristóteles de A. Pires¹,
Leticia R. Machado¹, Themis R. Silveira¹

OBJETIVO: Avaliar comparativamente os níveis séricos de PIIP com o estudo histológico de lactentes hepatopatas.

PACIENTES E MÉTODOS: Foram avaliados 38 pacientes, com idade entre 5 e 104 semanas, com hepatopatia crônica de diferentes causas. A análise histológica foi feita conforme escore de Knodell, demonstrando quatro pacientes com escore 0, 11 com escore 1, 20 com escore 2 e três com escore 4.

RESULTADOS: Os níveis de PIIP demonstraram elevação em 12 pacientes, diminuição em 10 pacientes e níveis dentro da faixa de normalidade para faixa etária em 16 pacientes, demonstrando uma grande variabilidade nos valores. A análise estatística da comparação do PIIP com fibrose teve $r = 0,549$, com teste de correlação de Spearman de $-0,25$. O odds ratio foi de 1,47 correlacionando níveis elevados de PIIP com fibrose.

CONCLUSÕES: Estes dados permitem concluir que o PIIP não foi um marcador adequado para a fibrose hepática no grupo de lactentes. A análise histológica permanece como método de escolha.

Unitermos: Hepatopatia crônica; fibrose; lactente; método de escolha.

Serum concentration of type III aminoterminal procollagen as a marker of hepatic fibrosis in infants with chronic hepatitis

OBJECTIVE: To compare type III aminoterminal procollagen serum levels with the histological hepatic study of infants with hepatitis

PATIENTS AND METHODS: We evaluated 38 patients, with ages that ranged from 5 to 104 weeks, and who had chronic hepatitis caused by different reasons. The histological analysis was carried out according to Knodell's score.

RESULTS: Four patients had a Knodell score of 0, 11 patients had a Knodell score of 1, 20 patients had a Knodell score of 2, and three patients had a Knodell score of 4. The levels of type III aminoterminal procollagen increased in 12 patients, decreased in 10 other patients, and were normal, for the respective age range of the patient, in the remaining 16 patients. The result of the statistical analysis of the comparison between type III aminoterminal procollagen and fibrosis was $P=0.549$, with Spearman's correlation test -0.25 . The odds ratio was 1.47, which correlates high levels of type III aminoterminal procollagen with fibrosis.

¹ Unidade de Gastroenterologia Pediátrica, Serviço de Pediatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Laboratório de Pesquisa do HCPA. Correspondência: GPPG, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: +55-51-316.8000. Fax: +55-51-332.8324.

CONCLUSION: We concluded that type III aminoterminal procollagen is not an adequate marker for hepatic fibrosis in infants. Histological analysis remains the method of choice.

Key-words: Chronic hepatopathy; fibrosis; infants; choice of method.

Revista HCPA 1998;18 (3):289-95

Introdução

A fibrose é um dos principais componentes das doenças crônicas do fígado. Inicialmente, há deposição de tecido conjuntivo no parênquima e evolução para cirrose (1,2). O aumento do tecido conjuntivo nem sempre é uniforme, podendo atingir um grau mais ou menos acentuado em diferentes partes de um mesmo fígado. O colágeno que equivale a 5 a 10% da proteína em pessoas sem doença, pode representar até 50% em pacientes cirróticos (3). As alterações bioquímicas decorrentes da perda de função hepática são tardias e não acompanham o progresso da lesão (1).

A análise histológica da biópsia hepática (percutânea ou a céu aberto) é o método mais utilizado para avaliar a presença e evolução da fibrose. Contudo, todo método invasivo tem riscos, e a análise histológica não pode ser feita de maneira seriada como seria desejado, além de não representar o processo em toda a extensão do órgão (2, 4).

Tem-se estudado, há algum tempo, marcadores séricos que possam facilitar a monitorização da fibrose, um processo complexo e dinâmico que envolve alterações na quantidade dos componentes da matriz extra-celular, na ativação de células produtoras de material da matriz, na liberação de citocinas e na remodelação tecidual (2, 5-9).

A matriz extra-celular é dividida em três grandes grupos de substância: as proteínas (colágeno e elastina), os glicoconjugados (proteoglicanos e glicoproteínas) e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico) (9-11).

Entre os vários tipos de colágeno, o tipo I é encontrado no osso mineralizado e tecido conjuntivo, o tipo II na cartilagem e o tipo III somente no tecido conjuntivo (12). Usualmente encontra-se o colágeno tipo I circulante em níveis mais elevados, mas durante a resposta

fibroproliferativa, como a que ocorre durante o desenvolvimento do processo fibrótico, a elevação e deposição do tipo III precede a do tipo I (13). O fígado cirrótico pode conter seis vezes mais colágeno e proteoglicanos que um órgão sadio (14). Dentro do grupo do colágeno, o procolágeno aminoterminal tipo III (PIIIP) tem sido muito estudado, pois sendo um peptídeo liberado durante a biossíntese do colágeno (conversão do procolágeno III em colágeno III e também na degradação), é um indicador não invasivo dos níveis de colágeno tipo III, refletindo a intensidade da formação do tecido conjuntivo (2, 15). Alguns estudos demonstram que o PIIIP tem valor preditivo de atividade de doença hepática, principalmente em adultos. Em crianças, os valores normais de PIIIP são muito variados conforme a faixa etária, tendo sido vistas concentrações elevadas mesmo em crianças sem hepatopatia, mas em fase de crescimento rápido (16-18).

O objetivo do presente estudo é comparar a potencial utilidade dos níveis séricos deste componente da matriz extra-celular como marcador de fibrose hepática em crianças com hepatopatia crônica, comparando com a análise histológica.

Pacientes e métodos

Foram avaliados 38 lactentes que consultaram no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de janeiro de 1992 a março de 1996, em investigação de hepatopatia crônica e que se submeteram a biópsia hepática percutânea ou a céu aberto.

A idade variou de 5 a 104 semanas, sendo 13 do sexo feminino e 25 do sexo masculino.

As causas da hepatopatia foram: atresia de vias biliares extra-hepática em 15 pacientes,

hepatite neonatal em nove, cirrose criptogênica em seis, glicogenose em três, hepatoblastoma em dois, fibrose hepática congênita, deficiência de alfa-1-antitripsina e síndrome de Alagille em um paciente cada. Nenhum paciente tinha fibrose pulmonar ou doença reumática concomitante.

Dosagens séricas

As amostras séricas (soro) foram armazenadas, após centrifugação, em freezer a -40°C . Estudos prévios demonstraram que o estoque por período longo a pelo menos -20°C não induz mudanças significativas nos níveis de PIIIP (19).

O tempo médio entre a coleta sérica e a biópsia foi de 7 dias.

O procolágeno aminoterminal tipo III foi analisado por radioimunoensaio utilizando o Kit Procollagen® (PIIINP) da Orion Diagnóstica com antígeno humano e anticorpo policlonal (variação intra-ensaio 4% e inter-ensaio 5%). Foram considerados valores normais: Grupo A: 5 a 40 semanas: $46,6 \pm 16,4$ mg/ml; Grupo B: 41 a 60 semanas: $29,2 \pm 7,4$ mg/ml e Grupo C: 61 a 104 semanas: $21,5 \pm 5,0$ mg/ml (13).

Análise histológica

A análise histológica da fibrose foi feita por patologista (CTC) do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizando o Escore de Knodell (semi-quantitativo): ausência de fibrose = 0, expansão da fibrose portal = 1, pontes porta-porta = 2, pontes porta-centro = 3 e cirrose = 4 (20). Utilizaram-se as colorações

de hematoxilina-eosina, picrossírius, tricrômico PAS.

Análise estatística

A análise estatística foi feita através do método de Kruskal-Wallis para comparação do marcador sérico com o escore histológico de fibrose, com $P < 0,05$ e Teste de Correlação de Spearman para avaliar a relação entre o grau de fibrose e os níveis séricos dos marcadores.

Foram calculados a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo para avaliar a possível eficácia do PIIIP como teste marcador de fibrose. Para determinar a significância, foram calculados intervalos de confiança de 95% através da distribuição quadrática de Fleiss. A estimativa do efeito foi determinada pelo odds ratio (OR) com seus intervalos de confiança calculados pelo método proposto por Cornfield.

Resultados

A análise histológica demonstrou ausência de fibrose (Knodell 0) em quatro pacientes, expansão fibrose portal (1) em 11, expansão porta-porta (2) em 20 e cirrose (4) em três (figura 1).

Em relação ao PIIIP, no grupo A (5 a 40 semanas) 11 pacientes tiveram níveis elevados, 16 normais e sete diminuídos; no grupo B (41 a 60 sem) um paciente teve nível diminuído; e no grupo C (61 a 104 sem) dois pacientes tiveram níveis diminuídos e um elevado. A correlação do PIIINP com grau histológico de fibrose é mostrada na figura 2.

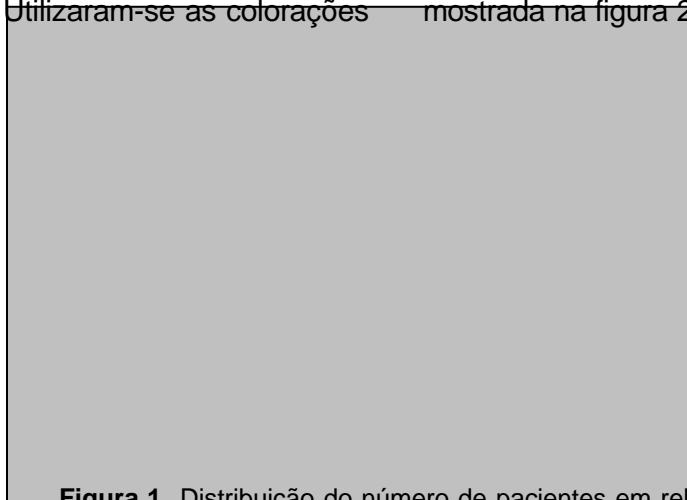


Figura 1. Distribuição do número de pacientes em relação ao grau de fibrose encontrado.

Tabela 1. Níveis séricos de PIIP e AH e grau de fibrose dos pacientes analisados, com diagnósticos e idade em semanas

Paciente	Sexo	Idade	Diagnóstico	Fibrose ^e	PIIP ^d
01	F	6m	Glicogenose	1	21,8
02	F	3m	Glicogenose	0	40,9
03	M	1a2m	FHC ^a	2	14,8
04	M	7m	AVBEH ^b	2	37,7
05	F	1m	Hepatite Neonatal	1	39,9
06	M	4m	AVBEH ^b	2	135
07	M	3m	Hepatite Neonatal	1	157
08	F	3m	AVBEH ^b	2	230
09	M	3m	Hepatite Neonatal	1	48,7
10	M	4m	Colestase	0	129
11	M	4m	Hepatite Neonatal	0	38,3
12	F	3m	AVBEH ^b	2	246
13	F	8m	Glicogenose	2	40,8
14	M	1a 8m	D1AT ^c	2	33,6
15	M	3m	Hepatoblastoma	2	63,0
16	F	4m	Cirroze biliar	4	44,5
17	M	3m	AVBEH ^b	2	100,5
18	M	2m	Hepatite Neonatal	0	150
19	F	3m	AVBEH ^b	2	69,0
20	F	7m	Cirroze biliar	4	31,1
21	M	3m	Hepatite Neonatal	1	30
22	M	3m	Atrofia VB	2	115,5
23	M	2m	AVBEH ^b	1	41,4
24	M	57d	AVBEH ^b	1	35,9
25	M	4m	AVBEH ^b	2	14,4
26	M	70d	Cir Criptog	1	43,1
27	M	4m	Hepatite Neonatal	1	247
28	F	3m	AVBEH ^b	2	29,3
29	M	3m	S. Alagille	2	59,4
30	M	2 a 2m	Fibrose	1	13,0
31	F	1a 10m	Hepatoblastoma	2	9,6
32	M	3m	Hepatite Neonatal	1	41,0
33	M	2m	Hepatite Neonatal	2	36,3
34	F	10m	AVBEH ^b	2	23,1
35	F	9m	Cirroze	4	28,2
36	F	8m	AVBEH ^b	2	22,6
37	M	6m	AVBEH ^b	2	33,6
38	M	3m	AVBEH ^b	2	29,7

^aFibrose hepática congênita, ^bAtresia de vias biliares extra-hepática, ^cDeficiência de 1-antitripsina ^eEscore de Knodell ^dValores de PIIP expressos em mg/ml



Figura 2. Correlação dos níveis séricos de PIIP (número de pacientes) com o grau de fibrose ($r = 0,549$).

A análise estatística da comparação da fibrose avaliada histologicamente com PIIP teve $P = 0,549$. A correlação de Spearman entre os níveis de PIIP e grau de fibrose foi $r = -0,25$.

As características dos pacientes avaliados, bem como os valores absolutos do PIIP e grau de fibrose estão discriminadas na tabela 1.

A sensibilidade do PIIP foi de 34,8%, com intervalo de confiança (95 %) de 17,2 a 57,2%, a especificidade foi de 73,3 % com intervalo de 44,8 a 91,1 %. O valor preditivo positivo foi de 66,7 % com intervalo de 35,4 a 88,8 % e valor preditivo negativo de 42,3 % com intervalo de 24 a 62,8 %.

O odds ratio (OR) do PIIP (elevado em relação a normal ou diminuído) para ausência de fibrose e fibrose mínima (Knodell e 1) ou fibrose moderada a cirrose (Knodell 2, 3 e 4) foi de 1,47 (intervalo de 0,35 a 6,13). O OR do PIIP elevado em relação ao normal para os mesmos critérios de fibrose foi de 3,05 (intervalo de 0,57 a 16,19).

Discussão

A análise histológica usada como padrão ouro para avaliação da fibrose hepática tem limitações técnicas e na interpretação dos resultados. Knodell definiu que a amostra ideal deveria ter mais de 2 cm e 6 espaços porta, sendo isto muitas vezes difícil, principalmente em crianças com biópsia percutânea (20). O fragmento obtido com a agulha de Menghini equivale a $\pm 1/63.000$ do volume do fígado de um adulto, e certamente não reflete as alterações do todo. Com isto, o que se pode dizer sobre o grau de fibrose de um fragmento analisado reflete a uma determinada área, inferindo-se que o restante tenha características semelhantes (21). A utilização do escore de Knodell para avaliação histológica demonstrou em estudos anteriores que a concordância para identificação da fibrose é bem satisfatória, tendo boa reprodutibilidade inter-observador, mesmo em relação a métodos mais descritivos, nos quais

Tabela 2. Descrição dos valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos níveis séricos de PIIP como marcador de fibrose hepática.

	Valor (%)	Intervalo de confiança
S	34,8%	[17,2-57,2]
E	73,3%	[44,8-91,1]
VPP	66,7%	[35,4-88,8]
VPN	42,3%	[24,0-62,8]

as características quantitativas ainda não estão bem estabelecidas (4,22).

A necessidade da identificação de marcadores não invasivos, que possam ser repetidos com frequência, permitindo acompanhar a evolução do quadro, e que representem mais uniformemente os achados hepáticos, tem levado ao estudo de diversos componentes da matriz, tentando encontrar algum com alta especificidade e sensibilidade(22,23).

Em estudos anteriores, o PIIIP teve correlação variada com o grau de fibrose hepática, tendo demonstrado significância em pacientes adultos, em graus que variam de 40 a 60% de sensibilidade e 65 a 80% de especificidade (24). Como os propeptídeos derivam tanto da neossíntese do colágeno como da degradação do colágeno maduro, o PIIIP parece estar mais associado com fibrogênese e processos inflamatórios e não com a extensão da fibrose. Também pode estar aumentado em algumas doenças extra-hepáticas como artrite reumatóide, escleroderma, doença pulmonar fibrosante bem como com exercício (2). Em outros estudos, está indicado como marcador de sobrevida (25).

Em crianças, diferente dos adultos, pode-se encontrar níveis elevados de PIIIP naqueles sem hepatopatia, relacionados com crescimento; bem como pode-se observar graus avançados de fibrose com valores séricos normais do peptídeo. Também pode-se encontrar valores diminuídos por desaceleração do crescimento relacionado a doença hepática ou a imunoterapia (2). Trivedi demonstrou em crianças com cirrose da índia um aumento dos níveis de PIIIP, mas sem relação com os achados histológicos hepáticos (26). Niemela sugere que a técnica de radioimunoensaio utilizada poderia não diferenciar os três peptídeos aparentemente diferentes relacionados a processos distintos do tecido conjuntivo (25), contudo a melhora da técnica de radioimunoensaio permitiu uma melhor acurácia (13,25).

Este estudo confirmou a grande variabilidade dos valores de PIIIP em lactentes, já demonstrada previamente. Foram observados valores elevados em 31,5% de valores elevados mas sem correlação com o grau de fibrose por biópsia ($P = 0,549$).

Vários autores utilizaram marcadores séricos, principalmente o PIIIP e ácido hialurônico em estudos com pacientes com cirrose biliar primária, sendo que a análise destes mostrou-se inconclusiva em relação a utilização de marcadores séricos (22,23). Em alguns estudos houve correlação entre PIIIP e AH com o grau de fibrose em adultos (12,22), mas não encontrou-se correlação com achados em hepatite (12), nem entre a B e C (13). Contudo houve aumento sérico destes marcadores, indicando aumento do metabolismo do tecido conjuntivo (12,13).

No nosso meio, Camacho et al observaram que doadores de sangue com anti-HVC +, analisando achados histológicos de hepatite crônica e fibrose e dosando transaminases, PIIIP e ácido hialurônico mostrou significância do PIIIP com relação a fibrose e hepatite crônica, o que não foi demonstrado com relação aos outros dois dados analisados (27).

Fatores inflamatórios como hormônios e citocinas dificultam a avaliação dos marcadores séricos, pois ativam a "cadeia" da fibrogênese, sendo liberados por fatores distintos de lesão hepática, como o interferon e fator necrose tumoral b (8).

Nesta amostra, os valores encontrados para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo demonstraram não ser este um teste confiável. O OR mostrou valores baixos e com intervalo de confiança muito elástico, o que dificulta a sua utilização.

Concluimos que a avaliação histológica permanece como método de escolha para monitorização da fibrose hepática, apesar de suas limitações. Em relação ao PIIIP em lactentes, mais estudos envolvendo outros marcadores séricos devem continuar a ser desenvolvidos, melhorando os métodos laboratoriais e buscando agentes séricos, mais específicos e que se correlacionem melhor com a histologia, principalmente em crianças.

Referências

1. Sherlock S. Cirrhosis hepatic. Disease of the liver and biliary system. 9° edition, 1998;357-69.
2. Plebani M, Burlina A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. Clin Biochem 1991;24:219-39.
3. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in

- normal and fibrotic liver: Collagens and glycoproteins. *Sem Liver Dis* 1990;10:1-10.
4. Bedossa P, Bioulac-Sage P, Callard P, Chevallier M, Degott C, Deugnier Y, et al. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;20(1):15-20.
 5. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Sem Liv Dis* 1990;10(1):56-65.
 6. Arthur MJP. Matrix degradation in the liver. *Sem Liv Dis* 1990;10(1):47-55.
 7. Bucher NLR, Robinson GS, Farmer SR. Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. *Sem Liv Dis* 1990;10(1):11-9.
 8. Friedman S. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Sem Liv Dis* 1990;10(1):20-9.
 9. Gressner AM, Bachem MG. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: Role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Sem Liv Dis* 1990;10(1):30-46.
 10. Biagini G, Ballardini G. Liver fibrosis and extracellular matrix. *J Hepatology* 1989;8:115-24.
 11. Kleman J, Giry-Lozingue C, Van der Rest M. Diversity and modularity of extracellular matrix macromolecules at the gene and protein levels. *J Hepat* 1995;22(Suppl 2):3-9.
 12. Trivedi P, Cheesaman P, Portmann B, Hegarty J, Mowat AP. Variation in serum type III procollagen peptide with age in healthy subjects and its comparative value in the assessment of disease activity in children and adults with chronic active hepatitis. *Eur J Clin Invest* 1985;15:69-74.
 13. Flier JS, Underhill LH. The cellular basis of hepatic fibrosis - Mechanisms and treatment strategies. *N Eng J Med* 1993;328(25):1828-35.
 14. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (Review). *N Eng J Med* 1979;301:13-23.
 15. Guéchet J, Poupon RE, Giral P, Balkau B, Giboudeau J, Poupon R. Relationship between procollagen III aminoterminal propeptide and hyaluronan serum levels and histological fibrosis in primary biliary cirrhosis and chronic viral hepatitis C. *J Hepatology* 1994;20:388-93.
 16. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H. Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis and chronic hepatitis C: a comparative analysis. *J Hepat* 1995;23:145-52.
 17. Risteli J, Niemi S, Trivedi P, Mäentausta O, Mowat AP, Risteli L. Rapid equilibrium radioimmunoassay for the amino-terminal propeptide human type III procollagen. *Clin Chem* 1988;34(1):715-18.
 18. Trivedi P, Risteli J, Risteli L, Hindmarsh PC, Brook CGD, Mowat AP. Serum concentrations of the type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children with growth disorders. *Ped Res* 1991;30(3):276-80.
 19. Torrs-Salinas M, Pares A, Caballeria J, et al. Serum procollagen type III peptide as a marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic patients. *Gastroent* 1986;90:1241-6.
 20. Knodell KG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-35.
 21. Feldmann G. Critical analysis of methods used to morphologically quantify hepatic fibrosis. *J Hepat* 1995;22(Suppl 2):49-54.
 22. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513-20.
 23. Ramadori G, Zohrens G, Manns M. Serum hyaluronate and type III procollagen aminoterminal propeptide concentration in chronic liver disease. Relationship to cirrhosis and disease activity. *Eur J Clin Invest* 1991;20:323-30.
 24. Trinchet JC. Clinical use of serum markers of fibrosis in chronic hepatitis. *J Hepatology* 1995;22(Suppl 2):89-95.
 25. Niemelä O, Risteli L, Sotaniemi EA, Stenbäck, Risteli J. Serum basement membrane and type III procollagen-related antigens in primary biliary cirrhosis. *J Hepat* 1988;6:307-14.
 26. Trivedi P, Risteli J, Risteli L, Tanner S, Bhawe S, Pandit AN, et al. Serum Type III procollagen and basement membrane proteins as noninvasive markers of hepatic pathology in Indian childhood cirrhosis. *Hepat* 1987;7(6):1249-53.
 27. Camacho V. Relação entre as concentrações séricas de pró-colágeno tipo III e ácido hialurônico com os achados histológicos de fígado em doadores de sangue portadores do anti-VHC. Porto Alegre, 1997.