

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

AVALIAÇÃO DE ELASTINA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA
NÃO ALCOÓLICA

CARINE LEITE

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

AVALIAÇÃO DE ELASTINA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA
NÃO ALCOÓLICA

CARINE LEITE

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski

Coorientadores: Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade

e Prof. Dr. Mário Reis Álvares da Silva.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção Doutor em Medicina:
Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

CIP - Catalogação na Publicação

Leite, Carine
AVALIAÇÃO DE ELASTINA NA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA
NÃO ALCOÓLICA / Carine Leite. -- 2019.
75 f.
Orientador: Carlos Thadeu Schmidt Cerski.

Coorientadores: Mário Reis Alvares da Silva, Manoel
Roberto Maciel Trindade.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. fibras elásticas. 2. doença hepática gordurosa
não alcoólica. 3. obesidade. 4. hepatite C. 5. fibrose
hepática. I. Cerski, Carlos Thadeu Schmidt, orient.
II. da Silva, Mário Reis Alvares, coorient. III.
Trindade, Manoel Roberto Maciel, coorient. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Primeiramente agradeço ao Prof. Dr. Manoel Roberto Maciel Trindade. Sempre foi para mim um grande exemplo de competência e capacidade técnica como médico e professor. Já me oportunizava sua parceria e aprendizado no trabalho, e agora me permitiu a realização deste trabalho, por ele idealizado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski, pelo seu incentivo e ensinamentos. Participou intensivamente de todos os processos deste trabalho, o qual por motivos secundários tivemos o desafio de terminar em um prazo de doze meses. Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares da Silva, pela sua disponibilidade em reinserir-me no doutorado. Ao Dr. Rodrigo Tzovenos Starosta, um profissional extremamente capacitado, sem o qual não poderíamos ter realizado um estudo com análise digital. Aos colegas cirurgiões Drs. Eduardo Neubarth Trindade e Pedro Funari Pereira, ao acadêmico de medicina Eduardo de Melo Monteiro, pelas suas contribuições.

Agradeço aos funcionários da equipe de Patologia Experimental pelo processamento de materiais. Ao PPG Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, pela oportunidade e por acreditar que esta pesquisa seria possível.

E, por fim, não poderia deixar de agradecer a compreensão da minha família, noivo e amigos, em momentos de minha ausência para dedicar-me a este estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA	10
1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS	11
1.1.1 ESTADIAMENTO DA DHGNA	14
1.1.2 TRATAMENTO	15
1.2 ETIOLOGIA E FISIOPATOGENIA	18
1.3 HISTOPATOLOGIA	19
1.3.1 HISTOLOGIA HEPÁTICA	20
1.3.2 HISTOPATOLOGIA DA DHGNA	21
2 FIBRAS ELÁSTICAS	23
2.1 FIBROSE HEPÁTICA E FIBRAS ELÁSTICAS	24
2.1.1 FIBRAS ELÁSTICAS NA HEPATITE C	26

2.1.2 FIBRAS ELÁSTICAS NA DHGNA E OUTRAS HEPATOPATIAS	27
2.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DA ELASTINA	27
2.3 ELASTINA HEPÁTICA E RELEVÂNCIA CLÍNICA	29
JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	31
QUESTÕES DE PESQUISA	32
HIPÓTESES	33
OBJETIVOS	34
1 OBJETIVO GERAL	34
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
REFERÊNCIAS	35
ARTIGO 1.	39
ARTIGO 2.	54
CONCLUSÕES	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	68

RESUMO

Introdução: a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) afeta 25,24% da população mundial. A obesidade é o principal fator de risco. A perda de peso expressiva através de cirurgia bariátrica pode melhorar ou reverter a esteatose, inflamação e fibrose hepática. Em processos fibrogênicos há aumento do depósito de fibras elásticas na matriz extracelular. O aumento da elastina tem sido associado a pior prognóstico entre portadores de hepatopatia crônica. Não sabemos se o grau de fibrose hepática está diretamente relacionado à densidade de fibras elásticas. Também não há estudo prévio avaliando se há redução na quantificação dessas fibras durante o processo de reversão de DHGNA. Objetivos: quantificar fibras elásticas em diferentes graus de fibrose hepática; avaliar densidade de fibras elásticas em biópsia hepática de pacientes obesos com DHGNA e comparar com um ano de pós-operatório de cirurgia bariátrica. Métodos: realizados dois estudos, o primeiro transversal, compreendendo indivíduos portadores de vírus C, apresentando diferentes graus de fibrose hepática em biópsias efetuadas entre 2011-2017; o segundo, corte retrospectiva de indivíduos portadores de DHGNA submetidos à cirurgia bariátrica entre março de 2016 e junho de 2017. Ambos grupos provenientes de nossa instituição (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Os fragmentos hepáticos foram analisados histologicamente através das colorações hematoxilina-eosina e picrossírius para avaliação histológica de Metavir e Brunt, e com orceína, para análise digital morfométrica através do *ImageJ*®, para avaliar fibras elásticas. A quantificação foi realizada por densidade integrada corrigida. Resultados: vinte e sete pacientes com vírus C foram avaliados. A densidade de fibras elásticas foi maior em fibrose avançada e houve correlação positiva com escore de Metavir (*Spearman* $r=0,609$, $p<0,001$). Trinta e sete pacientes submetidos à cirurgia bariátrica foram inclusos no segundo estudo. Índice de massa corporal, marcadores metabólicos, escore NAS e fibrose melhoraram significativamente após um ano do

procedimento. A densidade de fibras elásticas reduziu significativamente: $239,3 \times 10^3$ absorvância-micrômetro² (141,08 – 645,32) para $74,62 \times 10^3$ absorvância-micrômetro² (57,42 – 145,17), $p=0.007$. Conclusões: a deposição de elastina acompanha a progressão da fibrose e reverte em obesos portadores de DHGNA submetidos à cirurgia bariátrica.

Palavras-chave: fibras elásticas; doença hepática gordurosa não alcoólica; obesidade; hepatite C; fibrose hepática.

ABSTRACT

Introduction: nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) affects 25,24% of worldwide population. Obesity is the biggest risk factor. Weight loss through bariatric surgery can improve or even reverse steatosis, inflammation and liver fibrosis. During fibrogenic processes, there is increase of elastic fibers deposition in extracellular matrix. The elastin increase has been associated to worse prognosis among chronic hepatopathy patients. It is not known if fibrosis stage is associated to elastic fibers density. Also, there is no previous study that evaluates if there is reduction of these fibers' quantification in reversal of NAFLD. Aims: to quantify elastic fibers in different stages of fibrosis; to evaluate elastic fibers density in liver biopsy of obesity patients with NAFLD and to compare with one-year later biopsy. Methods: two studies were conducted. The first transversal, comprising hepatitis C patients with different stages of fibrosis whose liver biopsies were effectuated between 2011-2017. The second, a retrospective cohort of individuals submitted to bariatric surgery between March 2016 and June 2017. Both groups of patients were from our institution (Hospital de Clinicas de Porto Alegre). Liver samples were assessed with hematoxylin-eosin and Sirius red to Metavir and Brunt's classification, and with orcein to digital morphometric analysis with ImageJ® to evaluate elastic fibers. Quantification was accomplished by corrected integrated density. Results: twenty-seven hepatitis C patients were evaluated. Elastic fibers density was higher in advanced fibrosis patients and there was positive correlation with Metavir score (*Spearman* $r=0,609$, $p<0,001$). In the second study, thirty-seven bariatric patients were included. Body mass indexed, metabolic markers, NAFLD activity score and fibrosis improved after one year of the procedure. The elastic fibers density showed significant decrease: 239.3×10^3 absorbance-micrometer² (141.08 – 645.32) to 74.62×10^3 absorbance-micrometer² (57.42 – 145.17), $p=0.007$. Conclusions: the elastin deposition

accompanies the fibrosis progression and reverse among NAFLD obese patients submitted to bariatric surgery.

Keywords: elastic fibers; nonalcoholic fatty liver disease; obesity; hepatitis C; liver fibrosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AASLD</i>	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
ALT	Alanina aminotransferase
APRI	AST to platelets ratio index
AST	Aspartato aminotransferase
DCV	Doença cardiovascular
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EASL	<i>European Association for the Study of The Liver</i>
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
FIB-4	<i>Fibrosis-4</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
HbA1C	Hemoglobina glicosilada
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HE	Hematoxilina-eosina
IMC	Índice de massa corporal
HOMA	Homeostase - modelo de avaliação
MEC	Matriz extracelular

MMP	Metaloproteinase
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDI	Processamento digital de imagens
PNPLA	<i>Patatin-like phospholipase domain–containing</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTGO	Prova de tolerância à glicose oral
SAF	<i>Steatosis, Activity and Fibrosis</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 superfamily-2</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A epidemia de obesidade no Brasil. Fonte: Vigitel, Ministério da Saúde, p. 11.

Figura 2: História natural da DHGNA em indivíduos não diabéticos, p. 12.

Figura 3: História natural da DHGNA em indivíduos diabéticos, p. 13.

Figura 4: Procedimentos de cirurgia bariátrica mais comuns, p. 17.

Figura 5: Representação esquemática de fibra elástica, p. 23.

Figura 6: Representação de 8 bits, p. 27.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. DHGNA e Termos Correlatos, p. 10.

Tabela 2. Protocolo para uma avaliação abrangente dos doentes com suspeita de DHGNA, p. 14.

Tabela 3. Classificação de Kleiner e Brunt para DHGNA, p. 22.

INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma hepatopatia frequente e com aumento de incidência nos últimos anos. A possibilidade de evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular tem gerado intensa busca por conhecimento sobre sua fisiopatologia.

Os processos hepáticos inflamatórios e fibróticos levam à produção e depósito de elastina, que é um marcador de irreversibilidade e mau prognóstico. No entanto, esta proteína tem sido negligenciada em pesquisa sobre o tema e, conseqüentemente, na prática clínica. Este estudo busca quantificar fibras elásticas no fígado em portadores de DHGNA, além de analisar a evolução em pacientes que a trataram: obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Denomina-se doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA, ou NAFLD, do inglês *nonalcoholic fatty liver disease*) a patologia relacionada ao acúmulo de lipídio intra-hepatocitário, não relacionado ao uso de álcool, em mais de 5% dos hepatócitos. O espectro inclui: esteatose; esteato-hepatite não alcoólica (EHNA, ou NASH, do inglês "*nonalcoholic steatohepatitis*"); fibrose hepática com cirrose(1). Alguns termos são fundamentais para a discussão do tema, descritos na tabela a seguir baseada em guideline da AASLD(2).

Tabela 1. DHGNA e Termos Correlatos

DHGNA: compreende todo espectro de indivíduos sem consumo de álcool significativo, desde esteatose à cirrose.

Esteatose: presença de >5% de hepatócitos com esteatose, sem evidência de injúria celular na forma de balonização de hepatócitos ou fibrose.

Esteato-hepatite: presença de >5% de hepatócitos com esteatose, com inflamação e evidência de injúria celular na forma de balonização de hepatócitos ou fibrose.

Cirrose por esteato-hepatite: cirrose com evidência atual ou biópsia prévia evidenciando esteatose ou esteato-hepatite.

Escore NAS: escore composto por esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3), balonização (0-2) e fibrose (0,1a,1b,1c,2,3) indicado para acompanhamento de indivíduos com DHGNA

Escore SAF escore de quantificação de esteatose (0-3), atividade (0-2), fibrose (0-4).

Classificação de Kleiner e Brunt: avaliação histopatológica com vistas ao diagnóstico e estadiamento da DHGNA.

O diagnóstico da DHGNA requer a exclusão das causas secundárias de esteatose hepática como nutrição parenteral, hepatite C genótipo 3, toxinas, apolipoproteinemia, medicações (mais comuns amiodarona, corticoide, tamoxifeno, metotrexate, ácido valproico e anti-retrovirais) e erros inatos do metabolismo. Além disso deve haver um consumo diário de álcool <30 g para o sexo masculino e <20 g para o sexo feminino(3).

1.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A DHGNA é uma importante causa de doença hepática crônica incluindo cirrose; a prevalência global em uma meta-análise recente é de 25,24% (95% IC: 22.10-28.65)(4). Sua fisiopatologia está estreitamente ligada à síndrome metabólica; 51,34% dos portadores de DHGNA são obesos; 22,5% diabéticos e 69,1% dislipidêmicos(4). A prevalência tem aumentado, acompanhando o crescimento da obesidade(5). No Brasil, quase 20% da população é obesa(6).

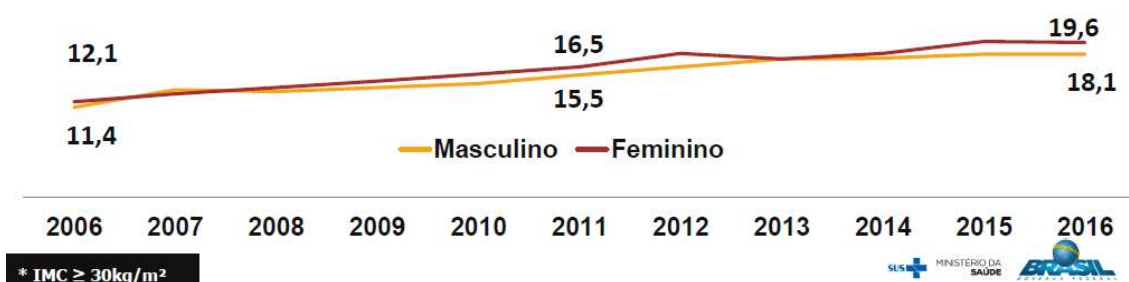


Figura 1. A epidemia de obesidade no Brasil. Fonte: Vigitel, Ministério da Saúde.

O *screening* de esteatose é realizado através de exames de imagem como ecografia e ressonância. O diagnóstico definitivo, em especial no caso de esteato-hepatite, é histológico(7). Cerca de 20% dos indivíduos com esteatose desenvolvem NASH, e destes 15-20% irão evoluir

para fibrose, o que aumenta progressivamente o risco de cirrose e carcinoma hepatocelular(8), em especial entre diabéticos, conforme as figuras 2 e 3. Nos Estados Unidos já é a segunda causa de transplante hepático entre casos de carcinoma hepatocelular(9). Descobriu-se que muitos indivíduos que eram considerados portadores de cirrose criptogênica teriam em realidade apresentado DHGNA não documentada como etiologia(10).

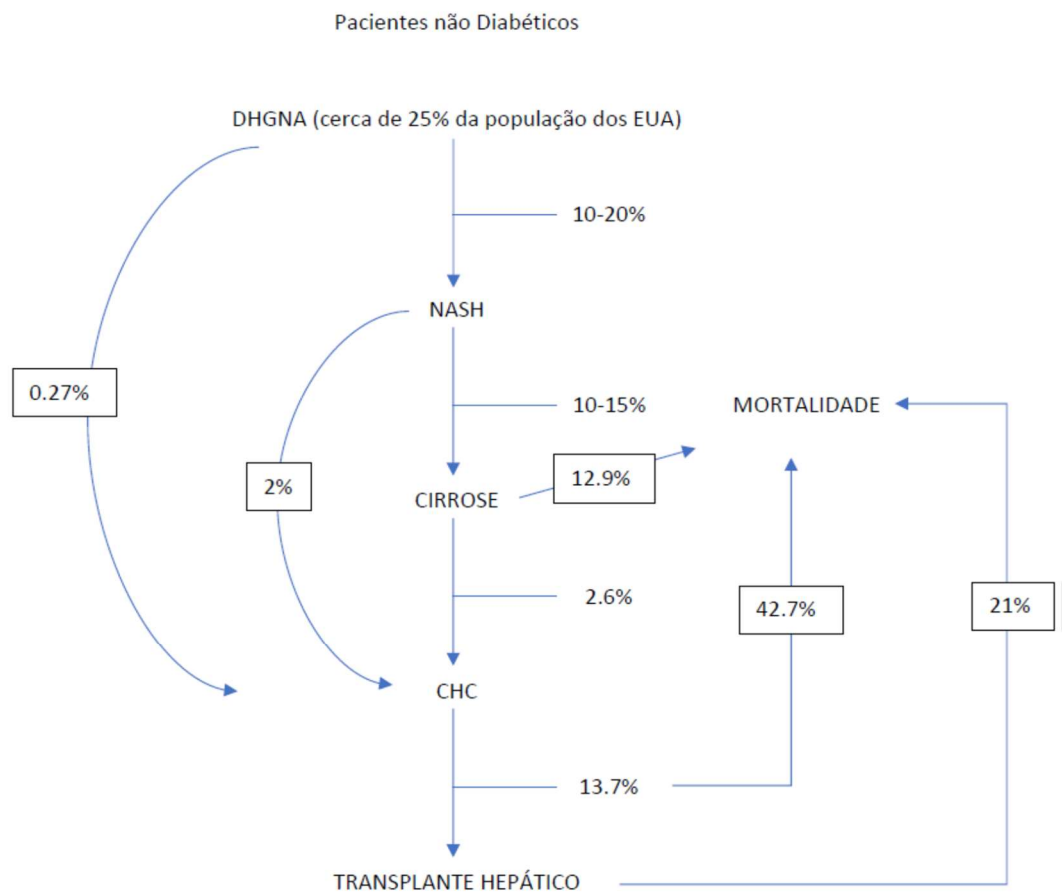


Figura 2. História natural da DHGNA em indivíduos não diabéticos. Adaptado de Younossi, 2018(11).

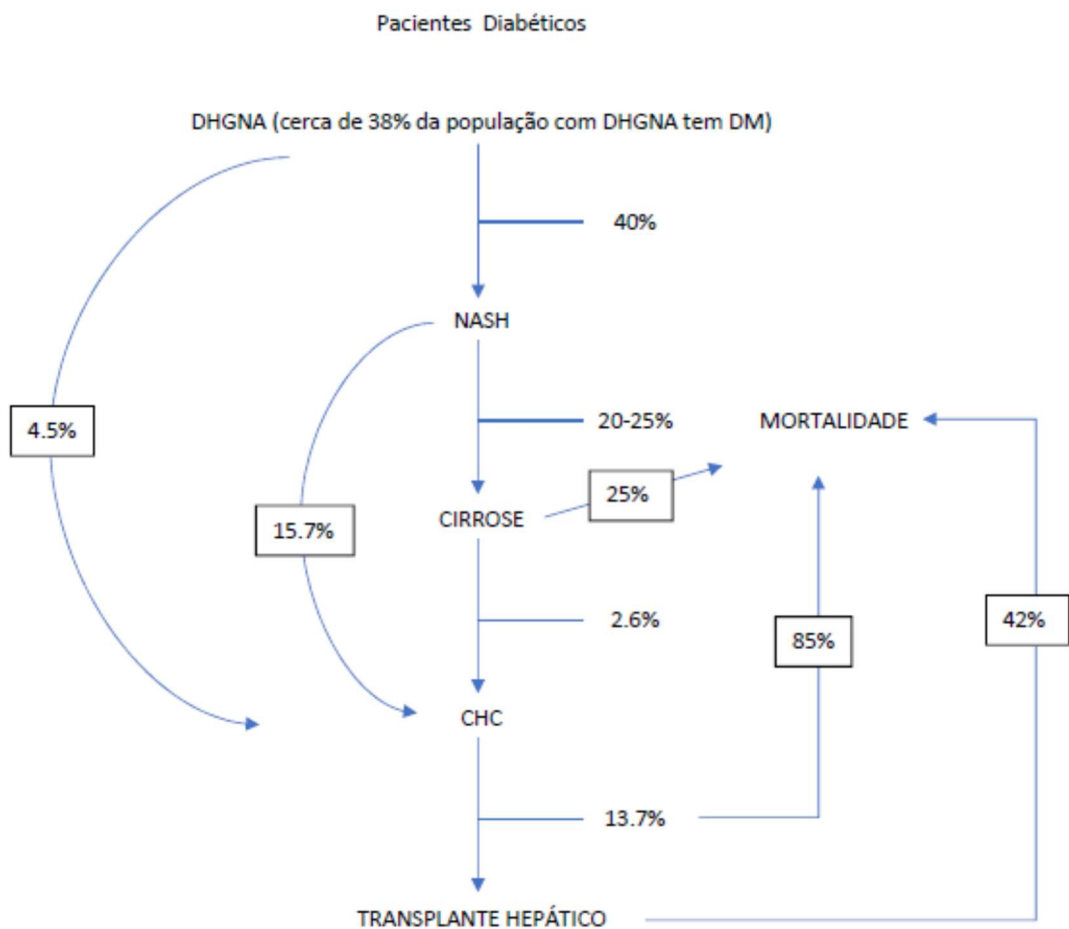


Figura 3. História natural da DHGNA em indivíduos diabéticos. Adaptado de Younossi, 2018(11).

Pelo risco de mau prognóstico em uma doença tão prevalente, há uma mobilização para melhor conhecimento e manejo clínico dos portadores. A EASL (*European Association for the Study of The Liver*) recomenda *screening* em pacientes com fatores de risco (síndrome metabólica e diabetes) através de exames de imagem e laboratoriais – provas de função hepática(1). Se houver alterações, devem ser excluídas patologias hepáticas associadas e procedida à avaliação de fibrose hepática, podendo ser inicialmente por métodos não invasivos. A biópsia hepática é reservada para casos graves e em especial de dúvida diagnóstica.

Tabela 2. Protocolo para uma avaliação abrangente dos doentes com suspeita de DHGNA

Consumo de álcool: <20 g/dia (mulheres), <30 g/dia (homens)
Antecedentes pessoais e familiares de diabetes, hipertensão e DCV
IMC, circunferência abdominal, alterações no peso corporal
Infeção pelo vírus da hepatite B/hepatite C
História de fármacos associados a esteatose
Enzimas hepáticas - aspartato e alanina transaminases, gama-glutamil transpeptidase
Glicemia em jejum, HbA1c, PTGO - insulina em jejum, HOMA
Hemograma
Níveis séricos colesterol total e HDL, triglicérides, ácido úrico
Ecografia (se existir suspeita por aumento das enzimas hepáticas)
Observação, em casos selecionados:
1. Ferritina e saturação de transferrina
2. Testes para a síndrome do ovário policístico, doença celíaca e tireoideia
3. Testes para doenças hepáticas raras (Wilson, doença autoimune, deficiência de alfa-1 antitripsina)

Adaptado de Normas de Orientação Clínica, EASL(1). DCV: doença cardiovascular; IMC: índice de massa corporal; HbA1c: hemoglobina glicosilada; PTGO: prova de tolerância à glicose oral; HOMA: homeostase, modelo de avaliação.

1.1.1 ESTADIAMENTO DA DHGNA

Além de avaliar a função hepática, deve ser verificado se o indivíduo já desenvolveu fibrose. Existem métodos não invasivos (imagem e escores) e invasivos (para casos graves ou de dúvida diagnóstica procede-se biópsia e histopatologia).

O *NASH fibrosis score* baseia-se em 6 variáveis prontamente disponíveis (idade, IMC, glicemia, contagem de plaquetas, albumina, relação AST:ALT). Aplicando-se o *cutoff* -1.455, fibrose avançada (em ponte ou cirrose) pode ser excluída com alta acurácia (valor preditivo negativo de 88%)(12).

O índice FIB-4 é um algoritmo baseado em dados clínicos: plaquetas, idade, AST e ALT. Oferece valores de corte duplos (os pacientes com escore <1.45 são improváveis com valor preditivo negativo de mais de 90%, enquanto pacientes com escore >3,25 provavelmente apresentam fibrose avançada)(2, 13).

O *fibroscan* é um método não invasivo para caracterizar fibrose, porém nos obesos mórbidos a ressonância magnética com elastografia tem melhor acurácia, sendo o método de escolha(14).

1.1.2 TRATAMENTO

A primeira linha de tratamento para melhora do dano em DHGNA é a perda de peso. No entanto, estudos já demonstram benefício de alguns fármacos:

- pioglitazona: ensaio clínico randomizado com evidência de melhora no escore NAS de inflamação sem resposta em fibrose(15), no entanto indicação de subgrupo diabéticos;
- antioxidante vitamina E: em ensaio clínico clássico evidenciou diminuição no escore NAS, porém sem resposta em fibrose e com necessidade de dose elevada a longo prazo(16);
- ácido obeticólico: agonista do receptor nuclear famesoide X, envolvido no metabolismo glicídico. Previamente já aprovado para colangite esclerosante primária com contraindicação ou sem resposta ao ácido ursodesoxicólico. O *FLINT trial* em 72 semanas demonstrou

resolução do NASH (22% e 13% placebo) e melhora da fibrose (35% e 19% placebo), tendo como possíveis efeitos discretos piora do perfil lipídico e prurido(17);

- elafibranor: age no receptor ativado de peroxissomos do metabolismo lipídico, o PPAR. evidenciou melhora em apenas alguns parâmetros histológicos do NASH, sem benefício na fibrose, a ser melhor esclarecido em novos ensaios clínicos(18).

- cenicriviroc: um antifibrótico que atua a nível de célula estrelada, em um ano resolução do NASH (8% e 6% placebo) e melhora da fibrose (20% e 10% placebo)(19).

- selonzertib: após 24 semanas, melhora da fibrose em até 43% dos pacientes(20);

- liraglutida: após 48 semanas, este análogo do GLP1 (peptídeo análogo ao glucagon) aumenta sensibilidade à insulina e perda de peso, evidenciou resolução de NASH em 39% dos indivíduos tratados em comparação com placebo de 9%(21).

A EASL recomenda como alicerce tratamento das comorbidades, mudança no estilo de vida e perda de peso – ao menos 7%(1). A perda sustentada de 10% é capaz de regredir algum grau de fibrose em até 45% dos indivíduos(22). Em estudo com obesos mórbidos submetidos à bariátrica, 85% dos indivíduos obtiveram resolução de NASH após 1 ano, e entre os casos com fibrose mais de um terço obtiveram melhora. Esta resposta é maior que qualquer fármaco até hoje estudado(23).

No mundo ocidental, apenas 17% dos casos de DHGNA ocorrem em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) normal. Cerca de metade dos pacientes são obesos no diagnóstico (IMC acima de 30 kg/m²)(24). Nestes casos apenas modificações na dieta e exercício podem não ser suficientes para emagrecimento significativo. Como vimos, a cirurgia bariátrica é o tratamento de melhor resposta nestes indivíduos, trouxe importante avanço na perda de peso. Indica-se o procedimento quando o IMC está acima de 40 kg/m² ou entre 35-40

kg/m² com comorbidades associadas(25). Os pacientes atingem uma média de perda de até 70% do excesso de peso corporal(26).

A cirurgia bariátrica pode ser restritiva, com redução da capacidade volumétrica gástrica (exemplo banda gástrica, gastrectomia vertical ou *Sleeve* e gastrectomia vertical com ou sem banda) ou disabsortiva, com redução da área de absorção intestinal (derivação biliopancreática com gastrectomia horizontal ou Scopinaro e derivação biliopancreática com gastrectomia vertical e preservação pilórica ou switch duodenal). Ainda existe a técnica mista, ou predominantemente restritiva, com derivação gástrica (gastroplastia) com derivação jejunal em Y de *Roux*, com ou sem anel de contenção gástrica(27, 28), figura 4.

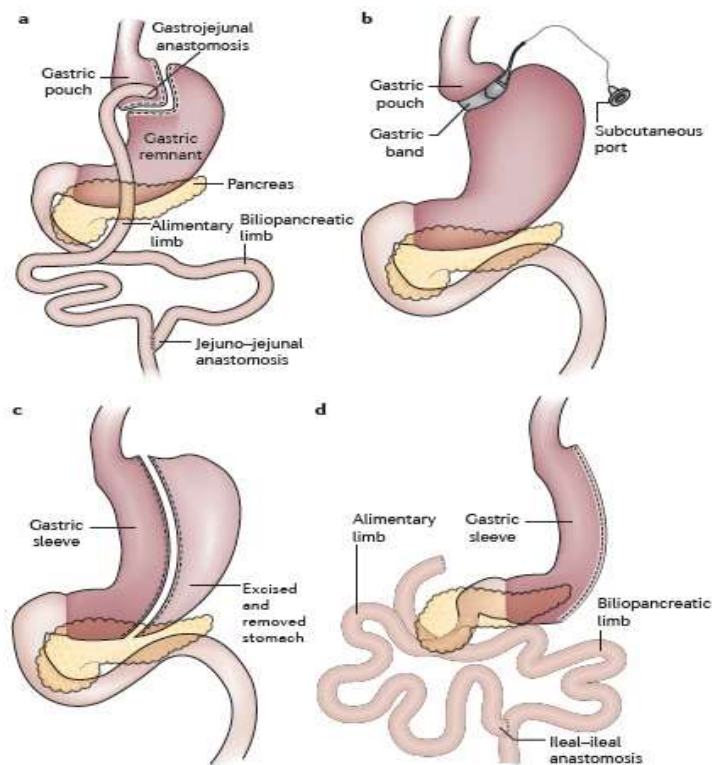


Figura 4. Procedimentos de cirurgia bariátrica mais comuns: a. gastroplastia redutora com bypass em Y de *Roux*; b. banda gástrica; c. gastrectomia vertical ou *Sleeve*; d. gastrectomia vertical com derivação biliopancreática ou *switch* duodenal. Adaptado de Nguyen, 2017.

Os portadores de DHGNA apresentam importante melhora e até resolução do dano hepático após a cirurgia bariátrica. Recente meta-análise reportou resolução de esteatose em 66% dos casos (IC 95%, 56%–75%), esteato-hepatite em 50% (IC 95%, 35%–64%) e fibrose em 40% dos casos (IC 95%, 29%–51%)(29). Além disso a intervenção melhora outros parâmetros metabólicos, com remissão de diabetes em até 60% dos pacientes(30). Por esta razão a intervenção também é denominada cirurgia metabólica(31).

1.2 ETIOLOGIA E FISIOPATOGENIA

A fisiopatogenia da DHGNA não está totalmente esclarecida. Acredita-se que um importante fator que inicie o processo seja a resistência à insulina(32). Nesta situação o tecido adiposo torna-se resistente ao efeito antilipolítico da insulina. Com isto há lipólise e aumento da liberação dos ácidos graxos(33). Estes são transportados e acumulados no fígado. A distribuição corporal do excesso de gordura é um outro fator importante, pois com o excesso de gordura visceral aumenta a fonte de lipídios. A “quebra” da gordura (lipólise do tecido adiposo) fornece cerca de 60% dos ácidos graxos usados para a síntese de triglicérides hepáticos. Os ácidos graxos não esterificados proveniente do tecido adiposo são transportados através da corrente sanguínea e absorvidos pelo fígado, com deposição nos hepatócitos, justificando a associação entre a obesidade e a maior probabilidade de desenvolver esteatose hepática. Ademais, quando há consumo elevado de carboidratos e gorduras há acúmulo de energia sob a forma de ácido graxo hepatocitário(34).

O ácido graxo hepático entra em rota metabólica com beta-oxidação, para geração de energia. Se não houver capacidade mitocondrial de utilização destas substâncias, ocorre

liberação de ácidos graxos na célula, ativação de inflamossomos, liberação de espécies reativas de oxigênio e *stress* oxidativo hepatocitário. Entre os fatores que prejudicam a atuação mitocondrial estão a sobrecarga de lipídios e o supercrescimento bacteriano intestinal. Neste último há acúmulo e contato de lipopolissacarídeos com circulação porta e estímulo do *Toll-like receptor 4*, presente nos hepatócitos e que gera ainda mais resposta inflamatória(35).

Com a disfunção mitocondrial também há em paralelo o acúmulo de colesterol livre e ceramidas que ativam as células de Kupffer e estreladas, gerando resposta inflamatória e fibrose(36).

Alguns fatores individuais predisõem ao desenvolvimento de DHGNA:

- fatores genéticos: polimorfismos do PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing 3) (exemplo I148M) e TM6SF2 (transmembrane 6 superfamily) são estreitamente relacionados à esteatose, inflamação, fibrose e carcinoma hepatocelular. O PNPLA3 codifica adiponutrina, uma lipase que regula metabolismo de triglicerídeos e retinol intra-hepatocitário(37) e o TM6SF2 codifica uma proteína que regula o conteúdo lipídico hepatocitário(38);
- fatores epigenéticos: modificações no DNA com tendência à obesidade(39);
- fatores ambientais: microbioma intestinal (eixo intestino-fígado), sendo a disbiose associada ao ganho de peso e os LPS bacterianos com processo fisiopatológico da esteato-hepatite(40); alterações no ciclo sono-vigília, que modificam várias rotas metabólicas e identificado como fator de risco para DHGNA e complicações(41, 42); capacidade aeróbica, sendo o sedentarismo portanto um fator de risco aquém do acúmulo de gordura visceral(43, 44).

1.3 HISTOPATOLOGIA

1.3.1 HISTOLOGIA HEPÁTICA

O fígado é composto por inúmeras unidades básicas chamadas lóbulos hepáticos, organizados formando uma estrutura similar a um hexágono. Em cada vértice encontramos uma estrutura chamada trato portal, que é composta por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ramo de um ducto biliar. Estas estruturas se apoiam em um tecido conjuntivo, e no centro do hexágono existe uma veia, chamada de veia centro lobular.

Entre o trato portal e a veia centro lobular encontram-se os hepatócitos. Eles são divididos por zonas, de acordo com sua relação com o trato portal e a veia centro lobular, os que estão em volta do trato portal são os hepatócitos da zona 1, os que estão em volta da veia central são os da zona 3, e os que ficam no meio são os da zona 2(45).

O fígado é vulnerável a insultos devido a sua função de metabolização de substâncias. A lesão hepática pode gerar os seguintes achados:

- inflamação ou hepatite: presença de células inflamatórias especialmente em espaço porta, quando progride e atinge os hepatócitos no lóbulo hepático denomina-se hepatite de interface;
- apoptose: morte de hepatócitos, podendo haver achados de necrose;
- degeneração hidrópica ou balonização: as células possuem um mecanismo de regulação da entrada de água dentro delas, quando por algum motivo ele fica prejudicado pode haver um influxo excessivo;
- regeneração: ao sofrerem qualquer tipo de agressão os hepatócitos se regeneram, e podem assumir alguns padrões, como o pseudoacinar (imitando uma formação de glândula);
- esteatose: acúmulo de triglicérides e colesterol dentro dos hepatócitos;

- corpúsculos de Mallory: são condensações grosseiras de proteínas do citoesqueleto da célula, normalmente são vistos em hepatócitos na zona 3 em agressão ao fígado por álcool;
- fibrose: após um insulto o fígado começa a se regenerar, há deposição de matriz extracelular e uma substituição dos hepatócitos necrosados por tecido fibrótico(46).

1.3.2 HISTOPATOLOGIA DA DHGNA

A esteatose hepática é caracterizada microscopicamente pela presença de triglicerídeos intra-hepatocitários, formando vesículas grandes que deslocam o núcleo (esteatose macrovesicular). Pequenas e múltiplas vesículas (esteatose microvesicular) é menos comum. Na DHGNA os hepatócitos sofrem balonização por degeneração hidrópica e apoptose. A presença de corpúsculos de Mallory, agregados intracitoplasmáticos de filamentos intermediários de citoqueratina, não é necessária para o diagnóstico da esteato-hepatite, mas pequenos, escassos e inconspícuos podem estar presentes. Inclusões eosinofílicas, que correspondem na microscopia eletrônica a megamitocôndrias, com perda das cristas e contendo inclusões são ocasionalmente observadas no citoplasma dos hepatócitos(47).

O processo de hepatite (esteato-hepatite) é a presença de achados inflamatórios associados à presença de gordura, em especial infiltrado polimorfonuclear perilobular em torno dos hepatócitos alterados(7).

Em estágios mais avançados da doença se encontra a fibrose, localizada próximo à veia centrolobular. É o principal fator prognóstico a ser observado(48). O processo de fibrose se inicia pelo depósito de matriz extracelular e colágeno no espaço perissinusoidal da zona 3. A fibrose periportal pode surgir em obesos mórbidos, e o avanço da doença progride para fibrose em ponte e nódulos de cirrose(49).

A avaliação histopatológica de DHGNA é realizada conforme classificação baseada no estudo de Kleiner e Brunt(50), vide tabela 3. Considerando-se grau de esteatose, balonização e inflamação lobular temos o escore NAS. Pontuação acima de 5 tem alta correlação com esteato-hepatite.

Tabela 3. Classificação de Kleiner e Brunt para DHGNA

Grau de Esteatose	Quantificação aproximada/hepatócitos
0	<5%
1	5-33%
2	34-66%
3	66%
Balonização	Quantificação
0	Nenhuma
1	Algumas células
2	Muitas células
Inflamação Lobular	Focos de Inflamação Lobular
0	Nenhum
1	0-2/20X
2	2-4/20X
3	>4/20X
Grau de Fibrose	
0	Ausente
1a	Fibrose leve, perissinusoidal zona 3
1b	Fibrose moderada, perissinusoidal zona 3
1c	Fibrose portal/periportal
2	Fibrose perissinusoidal e portal
3	Fibrose em ponte
4	Cirrose

Score NAS 0-8 (grau de esteatose 0-3 + balonização 0-2 + inflamação lobular 0-3); ≥ 5 NASH provável; ≤ 3 improvável.

2 FIBRAS ELÁSTICAS

O tecido elástico está presente em diversos tecidos humanos, em especial em locais onde há necessidade de maior elasticidade. É composto por duas proteínas, a elastina e a fibrilina, que compõem fibras elásticas, caracterizadas por serem separadas umas das outras, não constituindo feixes, como é o caso das fibras colágenas(51).

A fibrilina é a proteína que forma as microfibrilas, o “molde” das fibras elásticas, cujo centro é composto por elastina. Este polímero é derivado do polipeptídeo linear tropoelastina(52): figura 5.

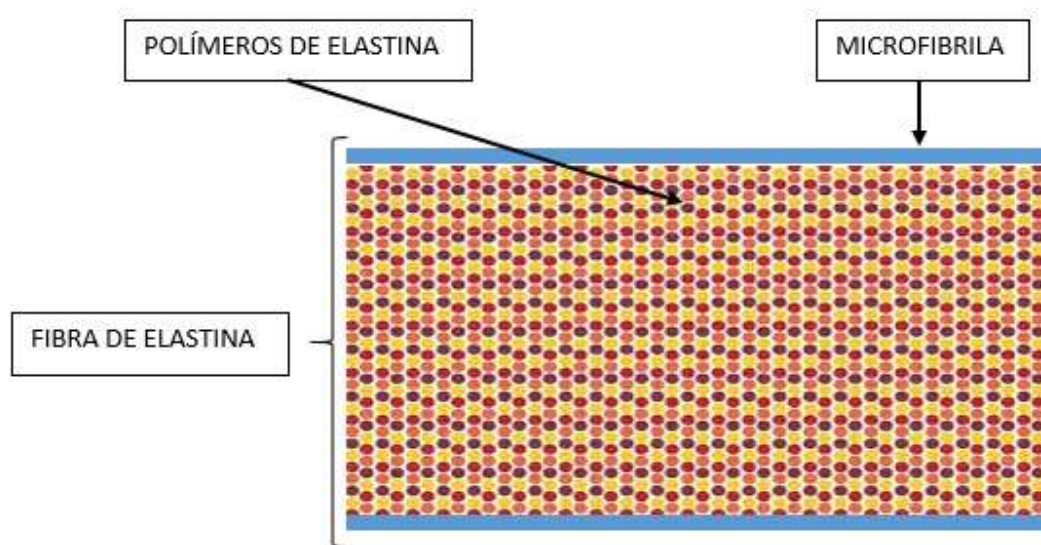


Figura 5. Representação esquemática de fibra elástica. Polímeros de elastina são depositados sucessivamente nas microfibrilas até a formação de fibra madura.

As fibras são diferentes entre si, qualitativamente. Dessa forma são classificadas em três tipos de acordo com o nível da elastogênese:

- Fibras oxitalânicas: são as precursoras do processo de elastogênese. São compostas por feixes de microfibrilas agregadas entre si sem material amorfo de permeio, medindo de 10 a 12nm de diâmetro. São secretadas por fibroblastos encontrados no meio extracelular e que se dispõem paralelamente entre si.
- Fibras elaunínicas: são fibras mais espessas quando comparadas à fibra oxitalânica, já que resultam da junção de material elastina amorfa às microfibrilas.
- Fibras elásticas maduras: decorrem do acúmulo de elastina no processo de elastogênese, originando fibras mais espessas(51).

2.1 FIBROSE HEPÁTICA E FIBRAS ELÁSTICAS

A matriz extracelular (MEC) forma uma espécie de malha fibrosa em volta das células teciduais. Fornece uma superfície para adesão e espaço para crescimento celular e migração. Atua como reservatório para moléculas de sinalização. No tecido hepático é composta por quatro classes de compostos: colágeno, glicosaminoglicanos, proteinoglicanos e elastina, a proteína mais estável da MEC(53).

No tecido hepático a elastina encontrada em pequenas quantidades em estados fisiológicos na zona periportal, junto à veia centrobular e subcapsular(54). Possui as três fases de desenvolvimento: fibras oxitalânicas compostas de microfibrilas e que conferem resistência; fibras elaunínicas compostas por microfibrilas e material amorfo; elástica madura, em que este

material amorfo acumular e forme um *core* central, conferindo resistência e encontrada principalmente na parede de vasos sanguíneos(55).

Em condições patológicas as células estreladas hepáticas, localizadas no espaço de Disse, são ativadas por citocinas e radicais livres liberados no processo inflamatório. Tais células se diferenciam e adquirem propriedades semelhantes às do miofibroblasto e iniciam a produzir maior quantidade de matriz extracelular. Inicialmente predomina o depósito de proteoglicanos (fibronectina) e colágenos tipo III e IV. Com a progressão da fibrose há aumento dos colágeno fibrilar (tipo I e IV) e elastina(56). Se não houver decomposição suficiente pelas metaloproteinases teciduais, os componentes da MEC evoluem para o tecido da cicatriz e fibrose(57).

De fato, o remodelamento contínuo da MEC durante lesões hepáticas crônicas leva a um acúmulo alterado e excessivo de proteínas extracelulares levando à fibrose, responsável pela morbimortalidade associada com insuficiência hepática. A elastina no tecido hepático normal corresponde a apenas 7% do volume da matriz extracelular. No entanto estudo evidenciou que em fibrose avançada por vírus C aumenta em 4x sua concentração, em comparação a pequenos incrementos na quantificação do colágeno(58).

Em casos de hepatectomia, o fígado se regenera com multiplicação de hepatócitos e aumento de MEC. A quantidade e localização de tecido elástico neste órgão regenerado é a mesma que de um fígado normal, ao contrário do que ocorre na injúria histológica em doenças crônicas acima descritas(59).

A fibra elástica é um elemento de alta estabilidade, acumulando-se tardiamente no processo de fibrose, e sendo degradada tardiamente em processos de reversão do quadro(60). Este trabalho é realizado pelas metaloproteinases, secretadas por células mesenquimais, macrófagos

e leucócitos, e que são reguladas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases ou TIMPs (61).

2.1.1 HEPATITE C CRÔNICA

A hepatite C crônica atinge cerca de 71 milhões de indivíduos no mundo, sendo a segunda maior causa de cirrose(62). O vírus da hepatite C é um RNA-vírus pertencente à família *Flaviviridae*(63). A transmissão é via parenteral (procedimentos sem correta desinfecção), uso de drogas injetáveis, transmissão vertical e sexual (relatos em homens que realizam sexo com homens)(64). O diagnóstico é realizado pela presença do anticorpo anti-HCV por mais de 6 meses com confirmação por PCR(65). O tratamento é realizado atualmente com antivirais de ação direta, de acordo com o genótipo(66). São bem tolerados e com taxa de resposta virológica sustentada (cura) de cerca de 90%(67).

Em hepatites virais crônicas o processo fibrótico se inicia no espaço porta. Com a deposição progressiva de matriz na zona 1 dos ácinos hepáticos há formação de septos que interconectam espaços-porta. Com a progressão da doença os septos se tornam mais espessos e vascularizados, distorcendo a arquitetura e originando nódulos. A classificação mais difundida para fibrose por infecção viral crônica é o Metavir. Classificam-se os estádios de fibrose em F0 (ausência de fibrose), F1 (alargamento dos espaços portais com septos curtos), F2 (septos conectando espaços porta-porta ou porta-veia centrolobular), F3 (septos numerosos) e F4 (cirrose)(68).

As fibras elásticas acompanham estas áreas de inflamação e fibrose. Até alguns anos atrás, a biópsia hepática era necessária para guiar o tratamento(69). Com isso material

histopatológico era amplamente disponível para trabalhos científicos. Os principais estudos em fibras elásticas avaliaram sua distribuição e correlação clínica em hepatite C crônica(70-72).

2.1.2 DHGNA E OUTRAS HEPATOPATIAS

Na DHGNA a fibrose se inicia junto à veia centro-lobular, em seguida no espaço porta e após na zona 3 do ácino(50). As fibras elásticas acompanham esta distribuição(73).

Na fibrose por hepatite alcoólica, fibras oxitalânicas são encontradas na zona perivenular. Em extensões fibróticas portais são encontradas fibras oxitalânicas e maduras(74). Outras hepatopatias ainda não foram avaliadas.

2.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DA ELASTINA

Na histologia, quando os tecidos que contêm colágeno são corados com hematoxilina e eosina (HE), as fibras elásticas quase não se distinguem do colágeno tipo I. Reagem com maior intensidade à eosina do que a fibra colágena, porém a diferenciação é sempre difícil. Deste modo, para a evidenciação das fibras elásticas são necessários métodos seletivos, como a orceína. Quando oxidada previamente por ácido peracético ou permanganato, cora predominantemente as oxitalânicas. Sem oxidação, as elauínicas e elásticas maduras(54).

As fibras elásticas coradas com orceína são visualizadas em vermelho-acastanhado; se for procedida à oxidação da lâmina de histologia com ácido peracético ou permanganato de

potássio antes da aplicação de orceína, podemos evidenciar as fibras oxitalânicas(75). Podem ser também avaliadas por imuno-histoquímica, utilizando anticorpo monoclonal específico(74).

Recentemente patologistas desenvolveram uma nova abordagem, a morfometria, que pode ser usada para quantificar a quantidade de elastina por área. Morfometria é descrição quantitativa dos achados geométricos de estruturas de qualquer dimensão. Os escores de fibrose são semiquantitativos e não podem ser definidos em valores lineares em testes estatísticos, ao contrário da morfometria que analisa de forma mais fidedigna a deposição de estruturas da MEC em processos fibrogênicos(76).

Quando obtemos uma foto exportada a um computador, estamos realizando um processamento digital de imagens (PDI). Existem dois tipos de imagens digitais: vetorial e bitmap. A imagem vetorial é geométrica e definida por meio de vetores matemáticos e permite o redimensionamento da imagem em qualquer escala sem perda de qualidade, usada por exemplo no AutoCAD®. Fotografias e imagens são digitalizadas em bitmap. A imagem bitmap é aquela mapeada por código binário ou bits, ou seja, a imagem está organizada em uma série de linhas e colunas (matriz). A imagem de 8-bits ocupa espaço de um byte, possui 8 linhas e colunas, cada uma com valor 0 ou 1, sendo assim há 256 possibilidades de tom ($2^8 = 256$), ou seja, de zero (preto absoluto) a 255 (branco absoluto ou ausência de cor).

0 ou 1	0 ou 1	0 ou 1	0 ou 1
0 ou 1	0 ou 1	0 ou 1	0 ou 1

Figura 6. Representação de 8 bits. Cada bit com duas possibilidades de cor $2^8 = 256$ tons.

Seleciona-se uma imagem no microscópio e abre-se o arquivo em processador de imagem como o *ImageJ*®, desenvolvido pelo National Institutes of Health dos Estados Unidos (77). Este é um *software* aberto de processamento e análise de imagens escrito em Java. Informa-se a cor do elemento a ser avaliado ao programa. Em geral para simplificação, a imagem pode ser convertida para escala de cinza de 8 bits.

O *software* capta as áreas que determinado corante ou anticorpo marcou, podendo-se obter parâmetros como: área em pixels, perímetro das captações, coeficiente de arredondamento e alongamento (referente à forma) e densidade(78).

2.3 ELASTINA HEPÁTICA E RELEVÂNCIA CLÍNICA

A elastina é o componente mais estável e de menor *turnover* da MEC por ser mais resistente à degradação de metaloproteinases(53). Por isso é um “marcador” de processos de fibrose crônicos e de mau prognóstico, podendo até indicar a irreversibilidade do processo(52).

A elastina é quimiotática para monócitos e polimorfonucleares, por tal razão promove aumento o processo inflamatório e fibrose(79). As fibras elásticas são resistentes às metaloproteinases, sendo degradadas tardiamente se houver processo bem-sucedido de reversão de fibrose. Além disso, estudos evidenciam que acúmulo de fibras elásticas é um preditor de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, independente das fibras de colágeno(80).

Kendaal e colaboradores(72) evidenciaram em coorte com portadores de vírus C, sem resposta aos antivirais, uma associação de quantificação hepática de elastina com complicações por cirrose. Entre os que apresentavam inicialmente uma mediana menor que 3.4% (quantificação por morfometria) houve 40% de complicações hepáticas em comparação com

73% entre os indivíduos com mediana acima deste corte. Assim se observa a heterogeneidade clínica dentro do subgrupo de pacientes F4. Metavir e Brunt são uma análise patológica qualitativa(81). Já a morfometria é mais abrangente e traz informações adicionais às classificações usuais da prática clínica. Ainda não foi possível relacionar a quantificação morfométrica de elastina de forma linear conforme o grau de fibrose(70).

Evidenciamos que a quantificação de elastina traz informações além da morfologia e estrutura da MEC. Estudos recentes parecem evidenciar teorias de sua relação com aspectos clínicos e prognósticos. Já é bem documentada a melhora dos parâmetros histológicos na DHGNA em pacientes submetidos a bariátrica, porém as fibras elásticas ainda não foram avaliadas(29).

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A fibrose é o mais importante fator prognóstico conhecido de DHGNA(48). A fibrogênese envolve deposição de MEC, sendo que um de seus elementos, a elastina, ainda é negligenciada pelos estudos atuais.

A deposição de elastina hepática pode representar um processo de fibrose irreversível e, portanto, com desfecho reservado. Assim o patologista pode trazer informações adicionais sobre o prognóstico do indivíduo. Ademais, o uso de métodos quantitativos como a morfometria são pouco explorados, apesar de conferirem objetividade à análise histológica.

Esses dados indicam a importância de quantificar as fibras elásticas no fígado de pacientes com a tão prevalente DHGNA. Para estudarmos esta questão, utilizamos uma população homogênea, constituída por indivíduos obesos com DHGNA submetidos à bariátrica. Entre estes indivíduos com condições de cirurgia, são raros casos de fibrose avançada. Faz-se necessário estudá-la em uma população heterogênea e com maior frequência de cirrose: portadores de hepatite C crônica.

QUESTÕES DE PESQUISA

Diferentes graus de fibrose hepática são associados a maior densidade de fibras elásticas e oxitalânicas?

A melhora histológica na reversão da DHGNA é acompanhada de redução na densidade de fibras elásticas?

HIPÓTESES

Há maior densidade de fibras elásticas hepáticas em pacientes com avançados graus de fibrose por hepatite C crônica.

A perda de peso após cirurgia bariátrica leva à melhora histológica de características de DHGNA, em conjunto com a redução na densidade de fibras elásticas hepáticas.

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a densidade de fibras elásticas em diferentes graus de fibrose hepática. Posteriormente avaliar as fibras elásticas em biópsia hepática de pacientes obesos com DHGNA e comparar com um ano de pós-operatório de cirurgia bariátrica.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever dados clínicos e epidemiológicos de indivíduos obesos com DHGNA submetidos à cirurgia bariátrica.
- Quantificar fibras elásticas hepáticas em DHGNA, comparando com achados de um ano após cirurgia bariátrica.
- Descrever dados clínicos e epidemiológicos de indivíduos portadores de hepatite C crônica.
- Quantificar fibras elásticas e oxitalânicas hepáticas em hepatite C crônica com diferentes graus de fibrose pelo Metavir.
- Descrever evolução clínica dos pacientes com vírus C e comparar com achados histopatológicos.

REFERÊNCIAS

1. (EASL) EAftSotL, (EASD) EAftSoD, (EASO) EAftSoO. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;67(1):328-57.
3. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol.* 2010;53(2):372-84.
4. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73-84.
5. (NCD-RisC) NRFC. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet.* 2016;387(10026):1377-96.
6. Saúde Md. Vigitel Brasil 2016 Edição, editor2017.
7. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(42):15539-48.
8. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol.* 2013;59(3):550-6.
9. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015;148(3):547-55.
10. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology.* 2000;32(4 Pt 1):689-92.
11. Younossi ZM, Henry L, Bush H, Mishra A. Clinical and Economic Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2018;22(1):1-10.
12. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45(4):846-54.
13. Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, et al. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:2.
14. Cui J, Heba E, Hernandez C, Haufe W, Hooker J, Andre MP, et al. Magnetic resonance elastography is superior to acoustic radiation force impulse for the Diagnosis of fibrosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease: A prospective study. *Hepatology.* 2016;63(2):453-61.
15. Cusi K. Treatment of patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: current approaches and future directions. *Diabetologia.* 2016;59(6):1112-20.
16. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010;362(18):1675-85.
17. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2015;385(9972):956-65.
18. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology.* 2016;150(5):1147-59.e5.

19. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, Abdelmalek MF, Aithal GP, Caballeria J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology*. 2018;67(5):1754-67.
20. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology*. 2017.
21. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016;387(10019):679-90.
22. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(2):367-78.e5; quiz e14-5.
23. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*. 2015;149(2):379-88; quiz e15-6.
24. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(6):319-27.
25. Mechanick JI, Youdim A, Jones DB, Garvey WT, Hurley DL, McMahon MM, et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient--2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21 Suppl 1:S1-27.
26. Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149(3):275-87.
27. Arterburn DE, Courcoulas AP. Bariatric surgery for obesity and metabolic conditions in adults. *BMJ*. 2014;349:g3961.
28. Nguyen NT, Varela JE. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(3):160-9.
29. Lee Y, Doumouras AG, Yu J, Brar K, Banfield L, Gmora S, et al. Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(6):1040-60.e11.
30. Cummings DE, Arterburn DE, Westbrook EO, Kuzma JN, Stewart SD, Chan CP, et al. Gastric bypass surgery vs intensive lifestyle and medical intervention for type 2 diabetes: the CROSSROADS randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2016;59(5):945-53.
31. Fried M. Bariatric and metabolic surgery. *Minerva Endocrinol*. 2013;38(3):237-44.
32. Kim JY, Nasr A, Tfayli H, Bacha F, Michaliszyn SF, Arslanian S. Increased Lipolysis, Diminished Adipose Tissue Insulin Sensitivity, and Impaired β -Cell Function Relative to Adipose Tissue Insulin Sensitivity in Obese Youth With Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes*. 2017;66(12):3085-90.
33. Wolf G. Role of fatty acids in the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nutr Rev*. 2008;66(10):597-600.
34. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5(5):1544-60.
35. Sharifnia T, Antoun J, Verriere TG, Suarez G, Wattacheril J, Wilson KT, et al. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(4):G270-8.
36. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology*. 2014;59(2):713-23.
37. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ, CRN N. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(3):894-903.

38. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2014;46(4):352-6.
39. Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: effect of dietary methyl donor supplementation. *Mol Genet Metab.* 2013;110(3):388-95.
40. Sanz Y, Santacruz A, De Palma G. Insights into the roles of gut microbes in obesity. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008;2008:829101.
41. Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N, et al. Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell.* 2016;30(6):909-24.
42. Johnston JD. Physiological links between circadian rhythms, metabolism and nutrition. *Exp Physiol.* 2014;99(9):1133-7.
43. Thyfault JP, Rector RS, Uptergrove GM, Borengasser SJ, Morris EM, Wei Y, et al. Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *J Physiol.* 2009;587(Pt 8):1805-16.
44. Sinton MC, Hay DC, Drake AJ. Metabolic control of gene transcription in non-alcoholic fatty liver disease: the role of the epigenome. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):104.
45. Krishna M. Microscopic anatomy of the liver. *Clin Liver Dis (Hoboken).* 2013;2(Suppl 1):S4-S7.
46. Robbins S, Cotran R. *Fundamentos de Patologia.* 6a, editor2001.
47. Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch.* 2004;444(1):3-12.
48. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).
49. Ratziu V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology.* 2000;118(6):1117-23.
50. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
51. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 14):2817-28.
52. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest.* 2006;116(3):753-9.
53. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(Suppl 1):S26.
54. Kanta J. Elastin in the Liver. *Front Physiol.* 2016;7:491.
55. Gardner A, Alexander R. Histochemistry of elastic and related fibres in the human eye in health and disease. *Histochem.* 1986;18:405-18.
56. Burt AD, Griffiths MR, Schuppan D, Voss B, MacSween RN. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immuno-gold labelling. *Histopathology.* 1990;16(1):53-8.
57. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1655-69.
58. Baiocchi A, Montaldo C, Conigliaro A, Grimaldi A, Correani V, Mura F, et al. Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151736.
59. Trindade MRM. O sistema elástico na matriz extracelular do fígado normal e na regeneração após hepatectomia parcial, em ratos.: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); 1996.
60. Chen W, Yan X, Xu A, Sun Y, Wang B, Huang T, et al. Dynamics of elastin in liver fibrosis: Accumulates late during progression and degrades slowly in regression. *J Cell Physiol.* 2019.
61. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997;14:144-57.
62. Collaborators POH. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(3):161-76.

63. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*. 2005;436(7053):933-8.
64. Millman AJ, Nelson NP, Vellozzi C. Hepatitis C: Review of the Epidemiology, Clinical Care, and Continued Challenges in the Direct Acting Antiviral Era. *Curr Epidemiol Rep*. 2017;4(2):174-85.
65. (CDC) CfDCaP. Vital signs: evaluation of hepatitis C virus infection testing and reporting - eight U.S. sites, 2005-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62(18):357-61.
66. Panel A-IHG. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDSAs Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis*. 2018;67(10):1477-92.
67. Daniel KE, Saeian K, Rizvi S. Real-world experiences with direct-acting antiviral agents for chronic hepatitis C treatment. *J Viral Hepat*. 2019.
68. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-93.
69. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*. 1998;352(9138):1426-32.
70. Yasui Y, Abe T, Kurosaki M, Matsunaga K, Higuchi M, Tamaki N, et al. Non-invasive liver fibrosis assessment correlates with collagen and elastic fiber quantity in patients with hepatitis C virus infection. *Hepato Res*. 2019;49(1):33-41.
71. Yasui Y, Abe T, Kurosaki M, Higuchi M, Komiyama Y, Yoshida T, et al. Elastin Fiber Accumulation in Liver Correlates with the Development of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154558.
72. Kendall TJ, Dolman GE, Duff CM, Paish EC, Zaitoun A, Irving W, et al. Hepatic elastin content is predictive of adverse outcome in advanced fibrotic liver disease. *Histopathology*. 2018;73(1):90-100.
73. Nakayama H, Itoh H, Kunita S, Kuroda N, Hiroi M, Matsuura H, et al. Presence of perivenular elastic fibers in nonalcoholic steatohepatitis Fibrosis Stage III. *Histol Histopathol*. 2008;23(4):407-9.
74. Porto LC, Chevallier M, Guerret S, Hartmann DJ, Grimaud JA. Elastin in alcoholic liver disease. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *Pathol Res Pract*. 1990;186(5):668-79.
75. Shousha S, Mitchell TR. Orcein staining of leukocytes. *Histochem J*. 1983;15(6):563-9.
76. Goodman ZD, Becker RL, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology*. 2007;45(4):886-94.
77. Research Services Branch NIOH. <https://imagej.nih.gov/ij/index.html> Washington DC, US, 2019.
78. Andrea C, Bleggi-Torres L, Alves M. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos *softwares* de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab* 2008;**44**.
79. Hauck M, Seres I, Kiss I, Saulnier J, Mohacsi A, Wallach J, et al. Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes. *Biochem Mol Biol Int*. 1995;37(1):45-55.
80. Yasui Y, Abe T, Kurosaki M, Higuchi M, Komiyama Y, Yoshida T, et al. Correction: Elastin Fiber Accumulation in Liver Correlates with the Development of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160133.
81. Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, Effendi K, Hashiguchi A, Abe M, et al. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepato Commun*. 2018;2(1):58-68.

ASSOCIATION BETWEEN HEPATIC FIBROSIS IN CHRONIC HEPATITIS C AND ELASTIC FIBERS

Carine Leite¹, Rodrigo Tzovenos Starosta², Eduardo Neubarth Trindade³, Manoel Roberto Maciel Trindade^{1,3}, Mário Reis Álvares-da-Silva^{1,4}, Carlos Thadeu Schmidt Cerski^{1,5}.

1 – Post-Graduate Program on Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

2 – Post-Graduate Program on Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

3 – Department of Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

4 - Department of Gastroenterology, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

5 – Department of Surgical Pathology, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author

Carine Leite

Email carineleite@hotmail.com

Address Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Gastroenterologia

Ramiro Barcelos, 2350 - Santa Cecilia, Porto Alegre – RS, 90035-007

Telephone number +55 51 33598000

As submitted to Surgical and Experimental Pathology number SAEP-D-19-00029

Surgical and Experimental Pathology
ASSOCIATION BETWEEN HEPATIC FIBROSIS IN CHRONIC HEPATITIS C AND ELASTIC FIBERS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	SAEP-D-19-00029	
Full Title:	ASSOCIATION BETWEEN HEPATIC FIBROSIS IN CHRONIC HEPATITIS C AND ELASTIC FIBERS	
Article Type:	Research	
Funding Information:	Hospital de Clínicas de Porto Alegre (170576)	Not applicable
Abstract:	<p>Background . Elastic fibers deposition is triggered during liver fibrosis process. They are related to worse clinical prognosis in chronic hepatitis C patients. This study aimed to verify if there is association between fibrosis stage and elastic fibers quantification in chronic hepatitis C. Methods . Individuals presenting with different degrees of fibrosis in liver biopsy were included. Slides of liver samples were stained with orcein with and without prior oxidation. Morphometric analysis was proceeded, and quantification accomplished by corrected integrated density. Results . Twenty-seven patients, mean age 52 years-old, 59% women, were included. Elastic fibers density was higher in advanced fibrosis patients and there was positive correlation with Metavir score (Spearman $r = 0.609$, $p < 0.001$), as well as with noninvasive scores Fib-4 (Pearson $r = 0.46$, $p = 0.029$) and APRI ($r = 0.52$, $p = 0.01$). Conclusion. In fibrosis and extracellular matrix deposition, elastic fibers density is higher in advanced stage of fibrosis.</p>	
Corresponding Author:	Carine Leite Ufrgs BRAZIL	

ASSOCIATION BETWEEN HEPATIC FIBROSIS IN CHRONIC HEPATITIS C AND ELASTIC FIBERS

ABSTRACT

Background. Elastic fibers deposition is triggered during liver fibrosis process. They are related to worse clinical prognosis in chronic hepatitis C patients. This study aimed to verify if there is association between fibrosis stage and elastic fibers quantification in chronic hepatitis C.

Methods. Individuals presenting with different degrees of fibrosis in liver biopsy were included. Slides of liver samples were stained with orcein with and without prior oxidation.

Morphometric analysis was proceeded, and quantification accomplished by corrected integrated density. *Results.* Twenty-seven patients, mean age 52 years-old, 59% women, were included.

Elastic fibers density was higher in advanced fibrosis patients and there was positive correlation with Metavir score (*Spearman* $r=0,609$, $p<0,001$), as well as with noninvasive scores Fib-4 (*Pearson* $r=0.46$, $p=0.029$) and APRI ($r=0.52$, $p=0.01$).

Conclusion. In fibrosis and extracellular matrix deposition, elastic fibers density is higher in advanced stage of fibrosis.

Keywords: liver fibrosis; chronic hepatitis C; elastic fibers.

BACKGROUND

Chronic hepatitis C affects 71 million people worldwide, and is a leading cause of cirrhosis and liver transplantation in most countries (Collaborators 2017). The grade of hepatic fibrosis is an important prognostic factor (Manns, Buti et al. 2017). To this purpose noninvasive methods have been developed, such as elastography, magnetic resonance and scores based on

laboratory test (Paranaguá-Vezozzo, Andrade et al. 2017). However, histological analysis of liver biopsy is the gold standard and allows better staging, through the evaluation of fibrosis by the Metavir score (Bedossa and Poynard 1996).

During fibrosis process, new elastic fibers are deposited in the extracellular matrix, conferring tissue resistance. Elastin is an amorphous protein highly resistant to degradation and is believed to be the most stable component among the extracellular matrix. It is degraded slowly and late in reversion of fibrosis, and may even cause irreversibility of the process (Chen, Yan et al. 2019).

Elastic tissue is already present in several human tissues, especially in places where there is a need for greater elasticity. In the healthy liver it is observed in small amounts, in the wall of arterioles and in portal tracts (Kanta 2016). In these locations it exerts a structural function, providing stability to the bile ducts and vessels under conditions of high ductal pressure (Mederacke, Hsu et al. 2013).

Elastic fibers are composed of two proteins, elastin and fibrillin, which are separated from each other instead of constituting bundles, as is the case of collagen (Kielty, Sherratt et al. 2002). Fibrillin forms microfibrils, the mold to elastic fibers; elastin forms the fibers' core (Houghton, Quintero et al. 2006). Chronic hepatitis C causes a cellular inflammatory response as a result of oxidative stress and immune response to hepatocytes expressing viral epitopes (Neumann-Haefelin and Thimme 2013). This response generates release of cytokines and growth factors that activate stellate cells in myofibroblasts, which synthesize extracellular matrix (Geerts 2001, Franceschini, Del Porto et al. 2012). In this matrix small amounts of elastic fibers are found (Burt, Griffiths et al. 1990). So fibrogenesis results deposition of elastin (Baiocchini, Montaldo et al. 2016). The immature or oxytalan fibers present only microfibrils, but during the elastogenesis they undergo deposition of elastin, generating mature elastic fibers in late process. On histopathology, orcein is one of the selective methods for staining these

fibers. When oxidation by peracetic acid or permanganate is accomplished, oxytalan fibers are visible (Nakayama, Itoh et al. 2008, Kanta 2016).

Authors found association of hepatic elastin with poor prognosis in patients with chronic hepatitis C (Kendall, Dolman et al. 2018), but it is not well defined if deposition of the fibers accompanies the fibrosis process in a progressive fashion (Yasui, Abe et al. 2019).

We hypothesize that the hepatic inflammatory damage caused by C virus leads to the deposition of elastin in the extracellular matrix in a progressive fashion. This study aims to verify if there is an association between histological stage and amount of elastic fibers in patients with chronic hepatitis C. For this purpose, we evaluate elastic fibers density in liver biopsies through morphometric analysis.

METHODS

Patients

This was a retrospective study. Inclusion criteria were: chronic hepatitis C confirmed with positive hepatitis C virus PCR and anti-HCV test lasting for more than six months; fibrosis from F0 to F4 by the Metavir classification; ultrasound-guided liver biopsy performed between January 2010 and December 2012 at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Individuals with another liver disease or current alcohol abuse were excluded, as well as cases with samples measuring less than 0.7 cm (which are considered nondiagnostic). Total of thirty-three cases were included.

This study was approved by Ethics Committee of the HCPA number 3.227.637 that waived informed consent due to its retrospective design, but authors signed a term to keep patients' data safe. The study was performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, 1975.

Study Variables

Demographic data, clinical history and biochemical tests were obtained from electronic records. Non-invasive fibrosis scores were calculated as follows: FIB-4 (Fibrosis-4) = age (years) x AST (IU/L) / platelets ($10^9/L$) x \sqrt{ALT} (IU/L); APRI (AST to platelets Ratio Index) = AST (IU/L) / ALT upper limit of normal x 100 / platelets ($10^9/L$) (Trang, Petersen et al. 2008).

Histopathology procedures

The paraffin-embedded liver samples were sectioned into 4 μ m-thick sections, deparaffinized and stained: one slide with hematoxylin-eosin, the other with Sirius Red staining, for Metavir score. They were reviewed by a second expert pathologist. The blocks were reprocessed for staining with orcein to verify mature elastic fibers, and a second slide was submitted to oxidation by potassium permanganate to highlight oxytalan fibers.

Morphometric analysis

The slides were analyzed with Olympus BX41 microscope in a magnification of 200X. Following microscope calibration, each fragment was photographed in its entire length with the Olympus DP73 microscope-attached camera and the CellSens® software. Five hundred images were generated and saved in TIFF format to allow for better resolution. The images were converted on ImageJ 1.8.0_112 to grayscale 8-bit images (Schneider, Rasband et al. 2012) and analyzed morphometrically as follows: to find the optical density of the elastic fibers, the gray value threshold was determined manually for each image to distinguish the particles (that is, the areas with gray values within the threshold range) from the background. The micrometer-to-pixel scale was calculated from the scale generated by CellSens® when each image was obtained.

Area and mean gray value (MGV) of each particle were obtained with ImageJ. The corrected density in absorbance-micrometer² per particle was obtained by the formula (255-

MGV)*area(Hartig 2013). Artifacts and white areas were manually removed. The sum of the corrected densities of all particles (corrected integrated density, CID; also known as corrected absorbance) corresponds to the quantification of elastic fibers in that region of the fragment, and the sum of CIDs of all the photographs corresponds to the sum of all densities in that individual slide. The division of the summed CIDs by the number of photographs informs the mean CID of elastic fibers per photograph, which was used in our analysis.

Statistical Analysis

Categorical variables were shown as number and proportion in percentage, and continuous variables were presented as mean and standard deviation. To compare between groups, quantitative variables presented symmetric distributions and Student t-test was performed. To assess correlation between two continuous or ordinal variables, Pearson or Spearman's rank-test were performed. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 33 patients were included, 5 were excluded due to insufficient sample (scarce material after reprocessing), and 1 due to the presence of concomitant hepatocellular carcinoma, comprising 27 individuals with ultrasound-guided needle biopsy. The mean age was 52 years, with a predominance of women. Arterial hypertension was the most frequent comorbidity (Table 1).

Table 1. Baseline sample characteristics

	Total 27
Age (years)	52.3 (11,15)
Female (%)	16 (59%)
White (%)	25 (92.5%)
Hypertension (%)	7 (26%)
Former alcohol abuse (%)	8 (29.6%)
Genotype	
1	12
2	2
3	11
4	0
Coinfection 1+3	1
FIB-4	2.58 (1.77)
APRI	1.3 (0.9)
Platelets (10³/mm³)	191.11 (66.97)
INR	1 (0.07)
Total bilirrubin (mg/dL)	0.74 (0.22)
Albumin (mg/dL)	4.23 (0.26)
Fibrosis Grade - Metavir	
F0	4
F1	5
F2	6
F3	5
F4	7

* *INR: international normalised ratio; FIB-4: Fibrosis-4; APRI: AST to platelets Ratio Index.*

Elastin quantification was verified in orcein-stained slides as described in methods (Fig. 1). It was observed that the mean elastic fibers density was significantly higher in the group with advanced fibrosis (Metavir F3-F4) compared to other individuals (Fig. 2). A higher mean was also observed in this group when analyzing oxytalan fibers, $p = 0.027$ (Fig. 3).

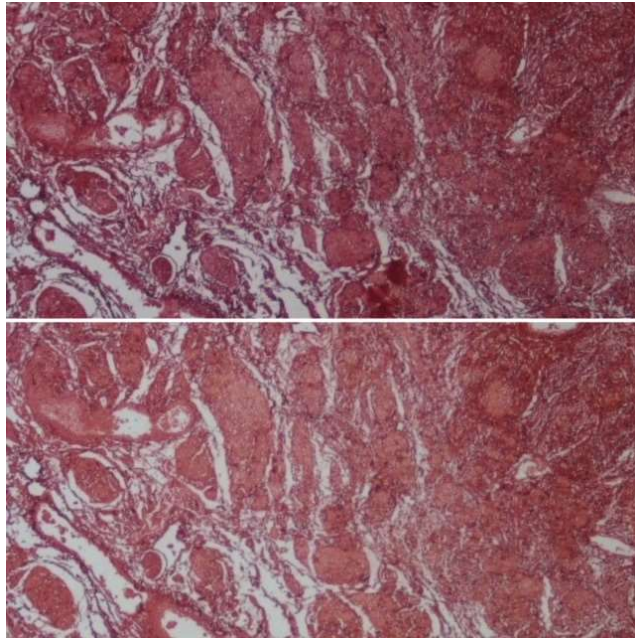


Fig. 1 Representative case of F4 fibrosis, stained with orcein, without and with prior oxidation (above and below respectively). Elastic fibers are observed in large numbers in the vessel wall as the upper right corner and in small bundles in the portal tract (orcein, 200x magnification).

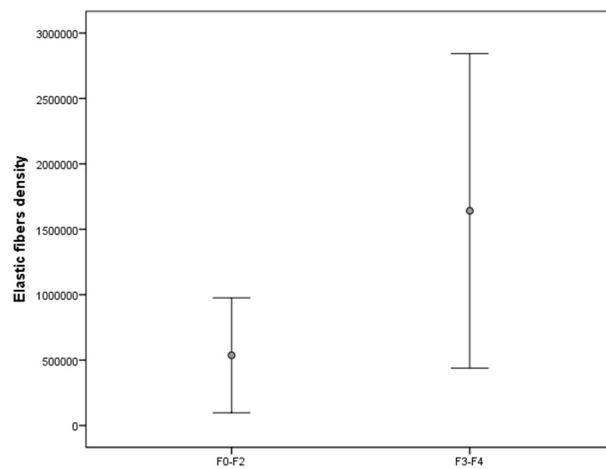


Fig. 2 Elastic fibers density in groups of early and advanced fibrosis. **F0-F2:** 536721.853 absorbance-micrometer² (438828.37) X **F3-F4:** 1641047.78 absorbance-micrometer² (1202749.82), $p= 0.001$.

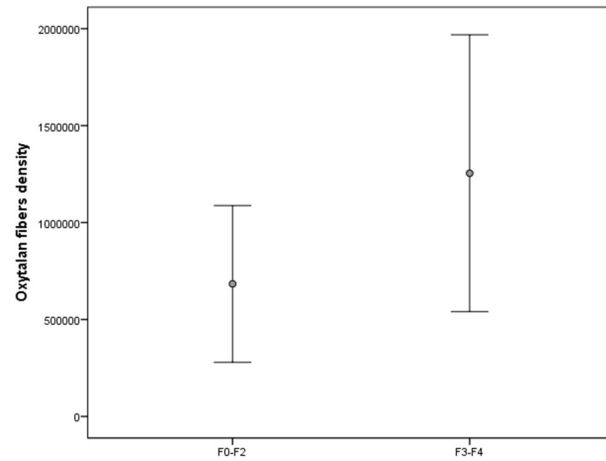


Fig. 3 Oxytalan fibers density in groups of early and advanced fibrosis. **F0-F2:** 683868.1 absorbance-micrometer² (404352.03) X **F3-F4:** 1254394.33 absorbance-micrometer² (714087.19), $p= 0.027$.

The Metavir fibrosis stage correlated linearly with the elastic fibers' density (Fig. 4). There was no significant correlation between oxytalan fibers and degree of fibrosis (Spearman correlation coefficient $r=0.38$ $p=0.063$). Actity score and genotype did not correlate to elastic fibers density.

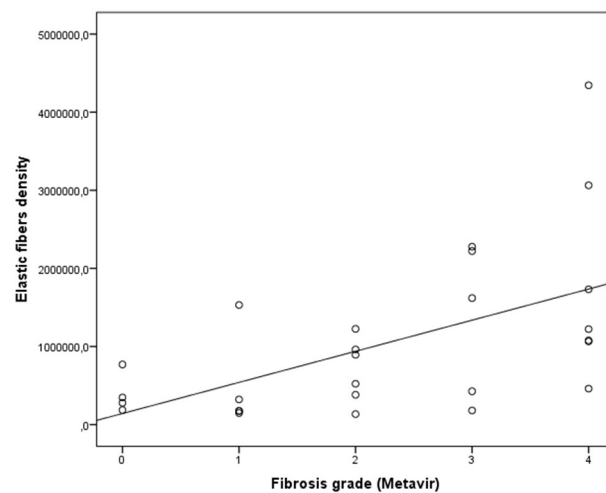


Fig. 4 Correlation of stage fibrosis and elastic fibers density, Spearman test, $r=0,609$, $p<0,001$.

We also analyzed noninvasive markers of fibrosis. The Fib-4 score showed a positive significant correlation with the elastic fibers quantification (Pearson correlation coefficient $r=0.46$, $p=0.029$), as well as APRI ($r= 0.52$, $p=0.01$). There was a correlation in the limit of

significance between Fib-4 and oxytalan fibers ($r=0.453$, $p=0.052$), but it was not observed for APRI ($r=0.366$, $p=0.12$).

Only four cohort patients had cirrhosis with complications (three cases of medium or large esophageal varices and one hepatocellular carcinoma). The mean elastic fibers density of this subgroup compared to others with advanced fibrosis were higher, but not significant: 2214964.367 absorbance-micrometer² (standard deviation = 1845734.588) versus 1449742.256 absorbance-micrometer² (standard deviation = 986260.9395), $p=0,1$.

DISCUSSION

This study revealed a positive correlation between the grade of hepatic fibrosis and density of elastic fibers, especially those with amorphous material (elastin). We found that noninvasive scores may also presume the degree of deposition of hepatic elastin. Fibrosis scores such as Metavir are ordinal or semi-quantitative. Morphometric analysis allows a more reliable evaluation of the deposition of extracellular matrix structures in fibrogenic processes, since it is quantitative (Goodman, Becker et al. 2007). Also it has several advantages over conventional visual assessment because of objectivity, reproducibility, and the ability to detect changes not apparent to the naked eye (Hamilton and Allen 1995). In hepatitis C treatment nonresponders, morphometric analysis demonstrated relevant worsening in fibrosis (80% increase of collagen content) in 4 years (Goodman, Stoddard et al. 2009). Only by direct measurement of fibrosis this change can become apparent, because histological stages are neither a continuous function nor a sensitive measure.

Hepatic elastic fibers have been first evaluated in non-alcoholic fat liver disease, with a higher amount found in the zone three of patients with advanced fibrosis (Nakayama, Itoh et

al. 2008). These fibers have emerged as new focus of research due to its possible relationship with worse prognosis in chronic hepatitis C and advanced fibrosis (Houghton, Quintero et al. 2006, Kendall, Dolman et al. 2018). Contrary to what was previously assumed, elastic fibers have been found in greater quantity in liver biopsies with F3 fibrosis in relation to F2, but there was no evidence of a linear relation with a fibrosis score by Metavir (Yasui, Abe et al. 2019). In these work, authors have quantified elastic fibers by measuring the percentage in which they occur in the total area of the fragment (Abe, Hashiguchi et al. 2013). In our work, on the other hand, we measure the corrected absorbance. This measure is more reliable and accurate because it verifies not only the affected area, but also the elastic fiber concentration or density, which may explain the difference of our findings. As in previous published literature, we found a positive correlation between non-invasive fibrosis scores and the fibers quantification (Masugi, Abe et al. 2018, Yasui, Abe et al. 2019).

The reported association of elastin with poor prognosis (Kendall, Dolman et al. 2018) might be explained by different stages of fibrosis in cirrhotic patients. The quantification of elastin allows more information than just the grade in Metavir, which does not reflect the heterogeneity of patients in the subgroup F4.

Our study has as limitation the non-evaluation by a second laboratory to compare the findings. However, we believe that the rigorous methodology makes findings reliable. In addition, due to the small sample, it was not possible to reach statistical significance to evaluate the prognosis of the individuals, although it was not a primary goal; we plan to conduct these analyses in another study with an increased sample. In addition, due to the cross-sectional design, this study does not provide information on more specific aspects of fibrosis triggers and elastic fibers synthesis.

CONCLUSION

In this way, in fibrosis and extracellular matrix deposition, the elastic fibers are in higher concentration in advanced stages of fibrogenesis. The quantification method adds relevant information to liver pathology study in chronic hepatitis C. Due to its relationship with worse prognosis and possibly irreversibility of fibrosis, we believe that elastin may play an important role in understanding the pathogenesis and the predictability of prognosis in viral cirrhosis.

Abbreviations

ALT: alanine aminotransferase; APRI: AST to platelets Ratio Index; AST aspartate aminotransferase; CID: corrected integrated density; FIB-4: Fibrosis-4; HCPA: Hospital de Clinicas de Porto Alegre; INR: international normalised ratio; MGV: mean gray value; PCR: polymerase chain reaction.

Ethical Approval

This study was approved by Ethics Committee of the HCPA number 3.227.637.

Consent for Publication

Not applicable.

Availability of data and materials

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The author(s) received financial support for the research by FIPE of Hospital de Clinicas.

Author's contribution

CL: design of study, participated in the acquisition of clinical data, analysis and interpretation of data, participated in writing manuscript. RTS: participated in digital analysis and writing manuscript. ENT, CTSC, MRAS, MRMT: responsible for the conception and design of the study, besides writing manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Informed Consent

The authors signed a declaration for Ethics Committee and are committed to keep patients' data confidential.

Acknowledgements

Not applicable.

REFERENCES

- Abe, T., A. Hashiguchi, K. Yamazaki, H. Ebinuma, H. Saito, H. Kumada, N. Izumi, N. Masaki and M. Sakamoto (2013). "Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens." *Pathol Int* **63**(6): 305-310.
- Baiocchini, A., C. Montaldo, A. Conigliaro, A. Grimaldi, V. Correani, F. Mura, F. Ciccocanti, N. Rotiroti, A. Brenna, M. Montalbano, G. D'Offizi, M. R. Capobianchi, R. Alessandro, M. Piacentini, M. E. Schininà, B. Maras, F. Del Nonno, M. Tripodi and C. Mancone (2016). "Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution." *PLoS One* **11**(3): e0151736.
- Bedossa, P. and T. Poynard (1996). "An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group." *Hepatology* **24**(2): 289-293.
- Burt, A. D., M. R. Griffiths, D. Schuppan, B. Voss and R. N. MacSween (1990). "Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immunogold labelling." *Histopathology* **16**(1): 53-58.
- Chen, W., X. Yan, A. Xu, Y. Sun, B. Wang, T. Huang, H. Wang, M. Cong, P. Wang, A. Yang, J. Jia and H. You (2019). "Dynamics of elastin in liver fibrosis: Accumulates late during progression and degrades slowly in regression." *J Cell Physiol.*
- Collaborators, P. O. H. (2017). "Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study." *Lancet Gastroenterol Hepatol* **2**(3): 161-176.
- Franceschini, D., P. Del Porto, S. Piconese, E. Trella, D. Accapezzato, M. Paroli, S. Morrone, E. Piccolella, E. Spada, A. Mele, J. Sidney, A. Sette and V. Barnaba (2012). "Polyfunctional type-1, -2, and -17 CD8⁺ T cell responses to apoptotic self-antigens correlate with the chronic evolution of hepatitis C virus infection." *PLoS Pathog* **8**(6): e1002759.
- Geerts, A. (2001). "History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells." *Semin Liver Dis* **21**(3): 311-335.

Goodman, Z. D., R. L. Becker, P. J. Pockros and N. H. Afdhal (2007). "Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis." *Hepatology* **45**(4): 886-894.

Goodman, Z. D., A. M. Stoddard, H. L. Bonkovsky, R. J. Fontana, M. G. Ghany, T. R. Morgan, E. C. Wright, E. M. Brunt, D. E. Kleiner, M. L. Shiffman, G. T. Everson, K. L. Lindsay, J. L. Dienstag, C. Morishima and H.-C. T. Group (2009). "Fibrosis progression in chronic hepatitis C: morphometric image analysis in the HALT-C trial." *Hepatology* **50**(6): 1738-1749.

Hamilton, P. and D. Allen (1995). "Morphometry in histopathology." *J. Pathol.* **175**: 369-379.

Hartig, S. M. (2013). "Basic image analysis and manipulation in ImageJ." *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 14**: Unit14.15.

Houghton, A. M., P. A. Quintero, D. L. Perkins, D. K. Kobayashi, D. G. Kelley, L. A. Marconcini, R. P. Mecham, R. M. Senior and S. D. Shapiro (2006). "Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema." *J Clin Invest* **116**(3): 753-759.

Kanta, J. (2016). "Elastin in the Liver." *Front Physiol* **7**: 491.

Kendall, T. J., G. E. Dolman, C. M. Duff, E. C. Paish, A. Zaitoun, W. Irving, J. A. Fallowfield and I. N. Guha (2018). "Hepatic elastin content is predictive of adverse outcome in advanced fibrotic liver disease." *Histopathology* **73**(1): 90-100.

Kiely, C. M., M. J. Sherratt and C. A. Shuttleworth (2002). "Elastic fibres." *J Cell Sci* **115**(Pt 14): 2817-2828.

Manns, M. P., M. Buti, E. Gane, J. M. Pawlotsky, H. Razavi, N. Terrault and Z. Younossi (2017). "Hepatitis C virus infection." *Nat Rev Dis Primers* **3**: 17006.

Masugi, Y., T. Abe, H. Tsujikawa, K. Effendi, A. Hashiguchi, M. Abe, Y. Imai, K. Hino, S. Hige, M. Kawanaka, G. Yamada, M. Kage, M. Korenaga, Y. Hiasa, M. Mizokami and M. Sakamoto (2018). "Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatol Commun* **2**(1): 58-68.

Mederacke, I., C. C. Hsu, J. S. Troeger, P. Huebener, X. Mu, D. H. Dapito, J. P. Pradere and R. F. Schwabe (2013). "Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology." *Nat Commun* **4**: 2823.

Nakayama, H., H. Itoh, S. Kunita, N. Kuroda, M. Hiroi, H. Matsuura, W. Yasui and H. Enzan (2008). "Presence of perivenular elastic fibers in nonalcoholic steatohepatitis Fibrosis Stage III." *Histol Histopathol* **23**(4): 407-409.

Neumann-Haefelin, C. and R. Thimme (2013). "Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection." *Curr Top Microbiol Immunol* **369**: 243-262.

Paranaguá-Vezozzo, D. C., A. Andrade, D. F. Mazo, V. Nunes, A. L. Guedes, T. G. Ragazzo, R. Moutinho, L. S. Nacif, S. K. Ono, V. A. Alves and F. J. Carrilho (2017). "Concordance of non-invasive mechanical and serum tests for liver fibrosis evaluation in chronic hepatitis C." *World J Hepatol* **9**(8): 436-442.

Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nat Methods* **9**(7): 671-675.

Trang, T., J. R. Petersen and N. Snyder (2008). "Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index." *Clin Chim Acta* **397**(1-2): 51-54.

Yasui, Y., T. Abe, M. Kurosaki, K. Matsunaga, M. Higuchi, N. Tamaki, K. Watakabe, M. Okada, W. Wang, T. Shimizu, K. Takaura, Y. Masugi, H. Nakanishi, K. Tsuchiya, Y. Takahashi, J. Itakura, U. Sakurai, A. Hashiguchi, M. Sakamoto and N. Izumi (2019). "Non-invasive liver fibrosis assessment correlates with collagen and elastic fiber quantity in patients with hepatitis C virus infection." *Hepatol Res* **49**(1): 33-41.

**ELASTIC FIBERS DENSITY: A NEW PARAMETER OF IMPROVEMENT OF
NAFLD IN BARIATRIC PATIENTS.**

Carine Leite¹, Rodrigo Tzovenos Starosta², Eduardo de Melo Monteiro³, Eduardo Neubarth Trindade⁴, Pedro Funari Pereira⁵, Manoel Roberto Maciel Trindade^{1,6}, Mário Reis Álvares-da-Silva^{1,7}, Carlos Thadeu Schmidt Cerski^{1,8}.

1 – Post-Graduate Program on Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

2 – Post-Graduate Program on Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

3 – School of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

4 – Department of Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

5 - Department of Surgery, Hospital São Francisco de Paula, Pelotas, RS, Brazil;

6 - Department of Gastroenterology, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

7 – Department of Surgical Pathology, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author

Carine Leite

Email carineleite@hotmail.com

Address Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Gastroenterologia

Ramiro Barcelos, 2350 - Santa Cecilia, Porto Alegre – RS, 90035-007

Telephone number +55 51 33598000

According to the submission rules of International Journal of Surgical Pathology.

ELASTIC FIBERS DENSITY: A NEW PARAMETER OF IMPROVEMENT OF NAFLD IN BARIATRIC PATIENTS.

Abstract

Introduction. Obesity is a major risk factor for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), that affects 25,24% of worldwide population. Weight loss through bariatric surgery can improve much of the liver steatosis, inflammation and fibrosis. However, it is not known if there is reversal of elastic fibers deposition process, triggered by hepatic damage, and related to worse prognosis. *Methods.* Individuals submitted to bariatric surgery at our institution, from March 2016 to June 2017, with trans-operative liver biopsy confirming NAFLD were approached. Those who consent were submitted to a second liver biopsy one year later and were included. Specimens were sliced and stained with hematoxylin-eosin and Sirius red, for histological assessment according to Brunt's criteria and with orcein, to digital analysis morphometrics on ImageJ®. Quantification of elastic fibers was accomplished by corrected integrated density. *Results.* Thirty-seven patients were included. Body mass indexed, metabolic markers, NAFLD activity score and fibrosis improved after one year of the procedure. The elastic fibers density showed significant decrease: 239.3×10^3 absorbance-micrometer² (141.08 – 645.32) to 74.62×10^3 absorbance-micrometer² (57.42 – 145.17), $p=0.007$. *Conclusion.* Liver elastic fibers density decreases in the reversal of NAFLD through weight loss.

Keywords: obesity; non-alcoholic fatty liver disease; elastic fibers.

INTRODUCTION

The (NAFLD) is frequent and affects 25,24% of worldwide population¹. Half of patients have obesity, the major risk factor². Around 20% of patients with liver steatosis develop steatohepatitis, of which 15-20% will develop fibrosis, that increases chance of cirrhosis and hepatocellular carcinoma³.

The mainstay therapy of NAFLD is weight loss. Bariatric surgery has the greater impact on this scope in obese patients. Recent meta-analysis reported a biopsy-confirmed resolution of steatosis in 66% of cases (95% CI, 56%–75%), steatohepatitis in 50% (95% CI, 35%–64%), and fibrosis in 40% (95% CI, 29%–51%)⁴. Besides, the intervention improves other metabolic parameters. Diabetes remission can be achieved in up to 60% of patients⁵.

In the healthy liver elastic fibers are observed in small amounts, in the wall of arterioles and in portal tract⁶. During inflammatory process of steatohepatitis, activated stellate cells produce these fibers in perivenular areas⁷. Inflammatory and fibrotic liver processes lead to successive deposit of elastic fibers on extracellular matrix^{7,8}. They are composed of two proteins, elastin and fibrillin, which are separated from each other instead of constituting bundles, as is the case of collagen⁹. Fibrillin forms microfibrils, the mold to elastic fibers; elastin forms the fibers' core¹⁰.

Elastic fibers are biochemically more stable than collagen, so its accumulation may contribute to irreversibility of fibrosis⁶. Nonetheless, they can be degraded, mostly in late phases of this process. This is of clinical relevance since the deposition of elastin has a possible relationship with worse prognosis in advanced fibrosis. It has been reported the association of higher elastin area ratio with higher risk of hepatocellular carcinoma and other complications

in chronic hepatitis C patients¹¹. This protein is chemotactic to neutrophils, promoting more inflammatory and fibrotic processes¹².

Elastin increase has been associated with worse prognosis in hepatitis C patients¹¹. Elastic fibers are stable and resistant. In experimental studies it was reported that they are degraded slowly in processes of fibrosis reversion, but it was not evaluated in humans¹³.

We hypothesize that bariatric surgery and expressive weight loss might reverse the liver inflammation and fibrosis process of NAFLD obese patients, thus reducing elastic fibers density. To test this hypothesis, we have accomplished a cohort of patients that have undergone bariatric surgery (gastric bypass) and analyzed perioperative and one-year control liver biopsy using digital morphometric analysis.

METHODS

Patients

This was a retrospective cohort study. Obesity patients submitted to laparoscopic bariatric surgery (Roux-en-Y gastric bypass) performed between March 2016 and June 2017 at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were screened, and all that confirmed diagnosis of NAFLD (intracellular fat in more than 5% of hepatocytes) in liver biopsy performed during the procedure were approached. Patients with another liver disease were excluded. High-risk for surgery and alcohol abuse (respectively more than 21 and 14 units of alcohol per week for men and women) were criteria to contraindicate surgical contraindication. Those who consent were submitted to a second liver biopsy one year later and were included.

Study Variables

Demographic data and clinical history such as sex, age, race, alcohol and smoking, clinical comorbidities, height and weight were obtained during appointments. The body mass index (BMI) was calculated as the weight (kg) divided by the square of the height (m). Blood samples were collected after 8 eight-hour fasting no more than six months before surgery and again at time of control biopsy. Non-invasive fibrosis score was calculated as follows: APRI (AST to platelets Ratio Index) = AST (UI/L) / ALT upper limit of normal x 100 / platelets ($10^9/L$)¹⁴.

Liver biopsy

It was performed a liver fine-needle (Unigun 18G, 160mm, Medax Medical Devices®) biopsy, during surgery. The procedure was repeated, ultrasound-guided, one year later.

Histopathology procedures

The paraffin-embedded liver samples were sectioned into 4 μ m-thick sections, deparaffinized and stained with hematoxylin-eosin and Sirius red. Histopathologic assessment was performed using Brunt's criteria. NAFLD/NASH was classified according to the necroinflammatory activity for the degree of hepatocellular steatosis, ballooning and inflammation (absent – grade 0; mild - grade 1; moderate - grade 2; severe - grade 3) and to the extent of fibrosis (no fibrosis – stage 0; zone 3 fibrosis – stage 1; zone 3 and portal fibrosis – stage 2; zone 3 and portal fibrosis with bridging fibrosis – stage 3; and cirrhosis – stage 4)¹⁵. They were reviewed by a second expert pathologist. One slide was stained with orcein to verify elastic fibers by morphometric analysis.

Morphometric analysis

The slides were analyzed with Olympus BX41 microscope in a magnification of 200X. Following microscope calibration, each fragment was photographed in its entire length with the Olympus DP73 microscope-attached camera and the CellSens® software. Five hundred images

were generated and saved in TIFF format to allow for better resolution. The images were converted on ImageJ 1.8.0_112 to grayscale 8-bit images¹⁶ and analyzed morphometrically as follows: to find the optical density of the elastic fibers, the gray value threshold was determined manually for each image to distinguish the particles (that is, the areas with gray values within the threshold range) from the background. The micrometer-to-pixel scale was calculated from the scale generated by CellSens® when each image was obtained.

Area and mean gray value (MGV) of each particle were obtained with ImageJ. The corrected density in absorbance-micrometer² per particle was obtained by the formula $(255 - \text{MGV}) * \text{area}$ ¹⁷. Artifacts and white areas were manually removed. Capsule regions were excluded. The sum of the corrected densities of all particles (corrected integrated density, CID; also known as corrected absorbance) corresponds to the quantification of elastic fibers in that region of the fragment, and the sum of CIDs of all the photographs corresponds to the sum of all densities in that individual slide. The division of the summed CIDs by the number of photographs informs the mean CID of elastic fibers per photograph, which was used in our analysis.

Statistical Analysis

Categorical variables were shown as number and proportion in percentage, and continuous variables were presented as mean and standard deviation. To compare between groups, Student's t Test test was performed for parametric quantitative variables and Wilcoxon to nonparametric. McNemar was performed to evaluate paired categorical data. To assess correlation between quantitative variables, Pearson was performed, and between categorical and continuous, Spearman. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Ethics

This study was approved by Ethics Committee of the HCPA numbers 1.887.117 and 3.227.637. All patients included signed an informed consent.

RESULTS

One hundred eighteen patients were submitted to bariatric surgery, among them 94 had NAFLD confirmed. Thirty-seven patients had consented a second liver biopsy one year later and were included in the analysis. Most patients were female (73.7%) with a medium age of 46.2 years (9.4). No patient with alcohol abuse. Eight were former and one active smoker. Hypertension was the most common comorbidity, see Table 1.

Table 1. Baseline sample characteristics

Variable	Total 37
Age years	46.2 (9.4)
Female (%)	28 (75.7%)
White (%)	32 (86.5%)
Hypertension (%)	23 (62.16%)
Diabetes or impaired fast glucose (%)	22 (59.46%)
Dyslipidemia (%)	9 (24.3%)
Depression (%)	5 (13.5%)
Smoking or former smoking	9 (24.32%)
BMI Kg/m²	48.22 (8.43)
NAS score	3.56 (1.66)
Brunt's fibrosis*	
0	19 (51.35%)
1a	8 (21.6%)
1b	9 (24.32%)
4	1 (2.7%)

*No case of fibrosis grade 1c, 2 or 3.

Abbreviations: NAS, nonalcoholic steatohepatitis activity score; BMI: body mass index.

There was a slightly higher density of elastic fibers among patients with liver fibrosis (F1) than no fibrosis (F0): 442.76×10^3 (181.95 – 1144.11) versus 179.43×10^3 (68.8 - 247.58) absorbance-micrometer², without statistical significance ($p=0.08$). There was a positive correlation between leukocyte count and elastic fibers density ($r'=0.4$, $p=0.048$), but we did not find with other variables.

Comparing to perioperative status, white blood cells count, APRI score, BMI and fast blood glucose were significantly reduced, see Table 2.

Table 2. Patient data on inclusion and one-year control.

Variable	Perioperative	One-year control	P value
Hemoglobin (mg/dL)	13.3 (1.2)	12.3 (1.2)	0.1
WBC count (cells/mm ³)	8279.2 (387.2)	6600 (307.81)	<0.001
Platelet count (cells/mm ³)	255000 (67411.77)	249125 (55745.78)	0.69
ALT (U/L)	26.88 (13.7)	21.12 (6.53)	0.12
AST (U/L)	20.11 (6.72)	20.11 (6.5)	0.99
APRI	0.22 (0.26)	0.07 (0.04)	0.017
Fast blood glucose (mg/DL)	115.32 (35.74)	89.32 (15.88)	<0.001
BMI (Kg/m ²)	48.22 (8.43)	33.61 (5.44)	<0.001

*Student's t Test

Abbreviations: WBC, White blood cell; AST: aspartate aminotransferase; ALT alanine aminotransferase.

The median of NAS reduced from 3.56 to 0.35, $p<0.001$ (fig.1). Almost half patients had fibrosis (45.9% F1 and 2.7% F4). In the control biopsy, the majority (94.6%) of patients had no fibrosis (fig.2). Among the seventeen F1 patients on inclusion, fifteen became F0 (88.2%, McNemar test $p<0.001$). The F4 individual became F1.

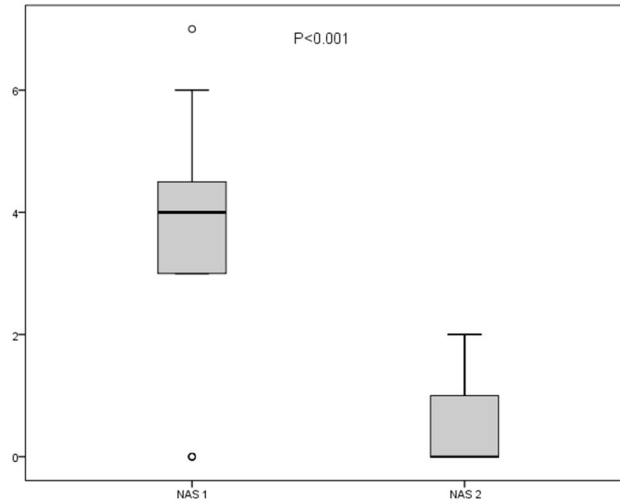


Fig. 1 NAFLD activity score (NAS), transoperative liver specimen (NAS 1) and one-year control (NAS 2): the NAS reduced from 3.56 (3-4.75) to 0.35 (0-1), $p < 0.001$, Wilcoxon Test.

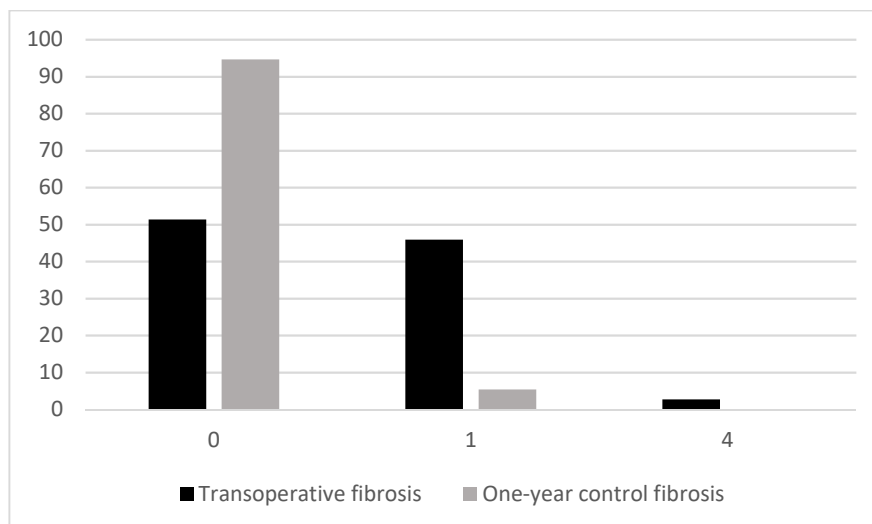


Fig. 2 Fibrosis stage of transoperative liver specimen and one-year control. Most patients (94.6%) had no fibrosis (F0) one year after surgery. The proportion of F1 reduced from 45.9% to 5.4%.

The elastic fibers density reduced after one year: the median of biopsy in the time of surgery was 239.3×10^3 absorbance-micrometer² (141.08 – 645.32) and of control one year later was 74.62×10^3 absorbance-micrometer² (57.42 – 145.17), $p = 0.007$ (fig 3). The reduction in elastic fibers density was accompanied by a decrease in ALT ($r = 0.78$, $p = 0.013$) and AST ($r = 0.63$, $p = 0.067$).

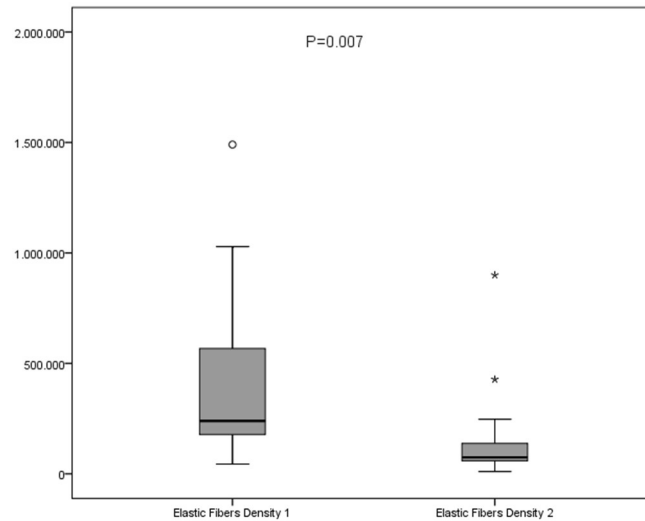


Fig. 3 Elastic fibers density, transoperative liver specimen (1) and one-year control (2): 239.3×10^3 absorbance-micrometer² (141.08 – 645.32) versus 74.62×10^3 absorbance-micrometer² (57.42 – 145.17), $p=0.007$, Wilcoxon Test.

DISCUSSION

The majority of obese patients improve NAFLD characteristics during follow-up after bariatric surgery⁴, but this is the first time that elastin is also evaluated. This study confirmed the hypothesis that weight loss can reduce hepatic elastic fibers density. NAS and fibrosis have significantly reduced one year after the procedure. As steatosis and the consequent inflammatory cascade resolves, it was expected that fibrotic triggers to elastic fibers secretion would halt. We have conducted digital morphometric analysis, which allows a reliable evaluation of the deposition of extracellular matrix structures in fibrogenic processes, since it is quantitative.

Nakayama *et al* examined orcein stain liver sections to evaluate the elastic fibers distribution⁷. In all twenty F3 Brunt's fibrosis grade cases, perivenular bundles were observed. In contrast, they were detected only in one of the six F1 and two of the twenty-two F2 cases. Masugi *et al* also studied elastic fibers quantification by morphometry in liver biopsy of lean

and obese NAFLD patients. The F3 and F4 patients showed a higher amount of fibers, confirming that there is an increase during fibrotic process¹⁸. It was a transversal study, and they could not evaluate what would occur in reversal of fibrosis, which our study has conducted.

Patients of this cohort had a significant decrease in leukocyte count. Elevated white blood cells, even within the normal range, may be a harbinger of increased systemic inflammation and subclinical disease^{19,20}. They are usually higher among obese individuals than controls²¹. The smaller count one year later may be a marker of a decreased inflammatory response that was generated by their metabolic syndrome²². We reported that WBC count correlates with elastic fibers density, which demonstrates that the more severe is the metabolic syndrome, the greater is liver inflammation and fibrosis process.

We observed a decrease in liver enzymes after one year. This is already described in literature and is a consequence of improvement in steatosis and liver inflammation^{23,24}. NAS decrease is an objective indication of this response²⁵. The fast blood glucose also reduced. Insulin resistance reduce in weight loss²⁶. The BMI reduction of our patients is the same as previously reported²⁷. Furthermore the bypass influence hormonal secretion, especially in the proximal part of small bowel, and increase secretion of glucagon-like peptide 1²⁸. For that reason bariatric is also named metabolic surgery²⁹.

One limitation of our work is that it did not include many patients with advanced fibrosis, since it is not common among individuals considered with adequate clinical condition for a surgical intervention. Then we could not evaluate elastic fibers density in different grades (F0-4). It would be possible with a longer cohort. The strengths include its design, allowing comparison between pre- and post-treatment. Also, we conducted a morphometric analysis, that is an objective evaluation of the deposition of extracellular matrix structures in fibrogenic processes³⁰. In our study we measure the corrected absorbance. This measure is more reliable

and accurate that percentage of area with elastic fibers, so it is possible to evaluate concentration or density.

In summary, this is the first cohort that evaluate the elastic fibers density in the reversal of NAFLD. Also, it adds more information about the benefits of bariatric surgery to liver histology. Elastin is a marker of prognosis, and its role in liver physiology should prompt future research.

REFERENCES

1. Younossi ZM, Henry L, Bush H, Mishra A. Clinical and Economic Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2018;22(1):1-10.
2. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore).* 2012;91(6):319-327.
3. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol.* 2013;59(3):550-556.
4. Lee Y, Doumouras AG, Yu J, et al. Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(6):1040-1060.e1011.
5. Cummings DE, Arterburn DE, Westbrook EO, et al. Gastric bypass surgery vs intensive lifestyle and medical intervention for type 2 diabetes: the CROSSROADS randomised controlled trial. *Diabetologia.* 2016;59(5):945-953.
6. Kanta J. Elastin in the Liver. *Front Physiol.* 2016;7:491.
7. Nakayama H, Itoh H, Kunita S, et al. Presence of perivenular elastic fibers in nonalcoholic steatohepatitis Fibrosis Stage III. *Histol Histopathol.* 2008;23(4):407-409.
8. Porto LC, Chevallier M, Guerret S, Hartmann DJ, Grimaud JA. Elastin in alcoholic liver disease. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *Pathol Res Pract.* 1990;186(5):668-679.
9. Kiely CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 14):2817-2828.
10. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest.* 2006;116(3):753-759.
11. Kendall TJ, Dolman GE, Duff CM, et al. Hepatic elastin content is predictive of adverse outcome in advanced fibrotic liver disease. *Histopathology.* 2018;73(1):90-100.
12. Hauck M, Seres I, Kiss I, et al. Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;37(1):45-55.
13. Chen W, Yan X, Xu A, et al. Dynamics of elastin in liver fibrosis: Accumulates late during progression and degrades slowly in regression. *J Cell Physiol.* 2019.
14. Trang T, Petersen JR, Snyder N. Non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients co-infected with HCV and HIV: comparison of the APRI and FIB-4 index. *Clin Chim Acta.* 2008;397(1-2):51-54.
15. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-1321.
16. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675.

17. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;Chapter 14:Unit14.15.
18. Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, et al. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Commun*. 2018;2(1):58-68.
19. Leng SX, Xue QL, Huang Y, Ferrucci L, Fried LP, Walston JD. Baseline total and specific differential white blood cell counts and 5-year all-cause mortality in community-dwelling older women. *Exp Gerontol*. 2005;40(12):982-987.
20. Elkind MS, Cheng J, Boden-Albala B, Paik MC, Sacco RL, Study NMS. Elevated white blood cell count and carotid plaque thickness : the northern manhattan stroke study. *Stroke*. 2001;32(4):842-849.
21. Furuncuoğlu Y, Tulgar S, Dogan AN, Cakar S, Tulgar YK, Cakiroglu B. How obesity affects the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio, systemic immune-inflammatory index and platelet indices: a retrospective study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(7):1300-1306.
22. Veronelli A, Laneri M, Ranieri R, et al. White blood cells in obesity and diabetes: effects of weight loss and normalization of glucose metabolism. *Diabetes Care*. 2004;27(10):2501-2502.
23. Nguyen NT, Varela JE. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(3):160-169.
24. Burza MA, Romeo S, Kotronen A, et al. Long-term effect of bariatric surgery on liver enzymes in the Swedish Obese Subjects (SOS) study. *PLoS One*. 2013;8(3):e60495.
25. von Schönfels W, Beckmann JH, Ahrens M, et al. Histologic improvement of NAFLD in patients with obesity after bariatric surgery based on standardized NAS (NAFLD activity score). *Surg Obes Relat Dis*. 2018;14(10):1607-1616.
26. Gancheva S, Ouni M, Jelenik T, et al. Dynamic changes of muscle insulin sensitivity after metabolic surgery. *Nat Commun*. 2019;10(1):4179.
27. Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149(3):275-287.
28. Meek CL, Lewis HB, Reimann F, Gribble FM, Park AJ. The effect of bariatric surgery on gastrointestinal and pancreatic peptide hormones. *Peptides*. 2016;77:28-37.
29. Fried M. Bariatric and metabolic surgery. *Minerva Endocrinol*. 2013;38(3):237-244.
30. Goodman ZD, Becker RL, Pockros PJ, Afdhal NH. Progression of fibrosis in advanced chronic hepatitis C: evaluation by morphometric image analysis. *Hepatology*. 2007;45(4):886-894.

CONCLUSÕES

- A cirurgia bariátrica traz importantes benefícios metabólicos aos indivíduos obesos mórbidos.
- A perda de peso leva à melhora de parâmetros histológicos de DHGNA.
- Em fibrose e deposição de matriz extracelular, a densidade de fibras elásticas é maior em avançados graus de fibrose.
- A densidade de fibras elásticas reduz em processo de reversão de DHGNA através da perda de peso pós-bariátrica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nossas hipóteses iniciais eram de que haveria maior densidade de fibras elásticas hepáticas em pacientes com avançados graus de fibrose, e que a perda de peso após cirurgia bariátrica gerasse melhora histológica da DHGNA acompanhada de redução na densidade de fibras elásticas hepáticas. Ambas foram avaliadas e confirmadas em nossos estudos.

Os processos hepáticos inflamatórios e fibróticos levam à produção e depósito de elastina, que é um marcador de irreversibilidade e mau prognóstico. No entanto esta proteína tem sido negligenciada em pesquisas sobre o tema. Acreditamos que nossas constatações tragam benefícios à ciência. Esperamos que estimulem novos estudos sobre fibras elásticas, especialmente para avançarmos no manejo de portadores de DHGNA.

