

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Contribuição genética dos Citocromos P450 2C9
e 2D6 e da Osteopontina na história natural da
Hepatite C Crónica**

Tânia Sofia Vitorino Barreto

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Contribuição genética dos Citocromos P450 2C9
e 2D6 e da Osteopontina na história natural da
Hepatite C Crónica**

Tânia Sofia Vitorino Barreto

Dissertação orientada por:

Orientador externo - Professor Doutor Manuel Bicho
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Orientador interno - Doutora Ângela Inácio
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2011

Agradecimentos

Foram várias as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e concretização desta etapa tão importante, e às quais quero deixar o meu profundo agradecimento.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Director do Laboratório de Genética, pela oportunidade concedida e por todo o apoio prestado.

À Professora Doutora Cláudia Marinho, pela disponibilidade, simpatia e motivação, assim como, pelos conselhos e críticas que me permitiram fazer mais e melhor. Muito obrigada.

À Doutora Ângela Inácio por todos os esclarecimentos e dedicação.

À Professora Doutora Deodália Dias, Professora e Coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, pela disponibilidade, aconselhamento e motivação.

À Dra. Joana Freitas, do Laboratório de Genética, pela disponibilidade e apoio prestado, principalmente na fase final desta etapa.

Aos meus colegas de laboratório que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho da melhor forma possível. Principalmente, à Andreia e à Ângela, pela amizade e motivação.

À Técnica Conceição Afonso, por todo o apoio prestado, a nível laboratorial e mural, por todos os conselhos e ensinamentos.

A todos os meus colegas e amigos, pelo companheirismo e dedicação.

Ao Paulo, por todo o apoio e motivação.

Por fim, e de uma forma muito especial, quero agradecer aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional, motivação, amor e amizade. Obrigada pelo que são e significam para mim, e por tornarem a conclusão desta etapa possível.

A todos a minha gratidão.

Resumo

O vírus da hepatite C (VHC), afecta aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo uma prevalência global, com variabilidade geográfica, de 3%.

A infecção pelo VHC é a principal causa de hepatite C crónica (HCC), cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.

As estatinas, inibidores do redutase do hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), e principalmente a fluvastatina (FLV), têm um efeito supressor viral. A FLV é metabolizada pelo citocromo P450 2C9 (CYP2C9). O estudo dos polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 deste CYP é importante como forma de avaliar se a resposta a uma futura terapia coadjuvante com FLV estará relacionada com o efeito da estatina, que poderá resultar da variação genética individual.

O polimorfismo CYP2D6*4 do citocromo P450 2D6 (CYP2D6) foi associado com a progressão da fibrose hepática em pacientes com HCC, e considerado um possível biomarcador não invasivo na identificação de pacientes com susceptibilidade para estadios mais avançados de fibrose, numa fase precoce da infecção.

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína ácida fosforilada que desempenha funções de citocina pró-inflamatória e quimiocina na imunidade celular. Na HCC correlaciona-se com a fibrose, a susceptibilidade para o desenvolvimento de cirrose hepática e com a resposta à terapêutica. Neste trabalho será estudado o polimorfismo C8090T da região codificante do gene da OPN.

Os objectivos deste trabalho foram avaliar a frequência da variação genética destes polimorfismos num grupo de pacientes com HCC quando comparada com a população controlo, e também a importância destas variantes na história natural da HCC.

Como conclusões deste estudo destacam-se: não foi possível associar o polimorfismo CYP2D6*4 com a história natural da HCC; relativamente à OPN, no polimorfismo C8090T, o genótipo CC está associado a uma maior susceptibilidade no desenvolvimento de HCC; no CYP2C9, a heterozigotia para as variantes CYP2C9*2 e CYP2C9*3 parece ser protectora em relação à

existência de esteatose, e à progressão para graus mais avançados de esteatose e estadios de fibrose, e como o grupo de pacientes com HCC é constituído predominantemente por metabolizadores extensivos (normais), parece adequada a utilização de fluvastatina como adjuvante à terapêutica padrão.

Palavras-chave: hepatite C crónica, polimorfismos CYP2C9 e 2D6, osteopontina, fibrose

Abstract

Hepatitis C virus (HCV), is estimated to affect approximately 200 million people worldwide, and has a global prevalence of 3% with geographical variability.

HCV infection is a major cause of chronic hepatitis C (CHC), liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Certain hydroxy-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins), most notably fluvastatin (FLV) have demonstrated a markedly viral suppressive effect. FLV is metabolized by the cytochrome P450 2C9. The study of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 polymorphisms of this CYP is particularly relevant in order to evaluate if the response to a future adjuvant therapy with FLV will be related with the drug effect, that could be a result of individual genetic variation.

The CYP2D6*4 polymorphism of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) was associated with an accelerated rate of hepatic fibrosis in patients with CHC. CYP2D6*4 might be used as a genetic non-invasive biomarker, enabling identification of HCV-infected patients that are prone to develop cirrhosis early in the course of the infection.

Osteopontin (OPN) is a phosphorylated acidic glycoprotein with proinflammatory cytokine and chemokine functions in cell-mediated immunity. In viral hepatitis, osteopontin correlates with fibrosis, susceptibility to development of liver cirrhosis and response to therapy. In this study, will be investigated the polymorphism C8090T in the coding region of OPN gene.

The aims of this work are to evaluate the frequencies of the genetic variation of these polymorphisms in patients with CHC when compared to a control group, and also the importance of these variants in the natural history of CHC.

In this study it was not possible to associate the CYP2D6*4 polymorphism with CHC natural history; regarding to OPN, in the C8090T polymorphism, the CC genotype is associated with major susceptibility to CHC development; in CYP2C9, the heterozygosity for CYP2C9*2 and CYP2C9*3 variants seems to be protective relatively to steatosis existence and progression and fibrosis stage, and given the predominance of extensive metabolizers (normal) in the CHC

patients, the use of FLV as adjuvant to standard therapy seems to be appropriate.

Key words: Chronic hepatitis C, CYP2C9 and 2D6 polymorphisms, osteopontin, fibrosis

Lista de Abreviaturas

- A - adenina
- AA - ácido araquidónico
- ADT - anti-depressivos tricíclicos
- AINEs - anti-inflamatórios não esteróides
- ALT - alanina aminotransferase
- ANOVA - análise de variância (do inglês, *analysis of variance*)
- ApoB-100 - apolipoproteína B-100
- ARAs - antagonistas dos receptores da angiotensina II
- Arg - arginina
- ASGPR- receptor da asialoglicoproteína (do inglês, *asialoglycoprotein receptor*)
- AST - aspartato aminotransferase
- CHC - *chronic hepatitis C*
- CYP - citocromo P450 (do inglês, *cytochrome P450*)
- Cys - cisteína (do inglês, *cysteine*)
- DAA - *direct-acting antivirals*
- DC SIGN - *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*
- dl - decilitro
- DM - diabetes *mellitus*
- DMSO - dimetil sulfóxido
- DNA - ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- dNTPs - desoxirribonucleotídeos
- ECMs - matriz(es) extracelular(es) (do inglês, *extracellular matrix*)
- EDTA - ácido etilendiaminotetraacético (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EROS - espécies reativas de oxigênio
- ETA-1 - *early T lymphocyte activation*
- FA - fosfatase ácida
- FLV - fluvastatina (do inglês, *fluvastatin*)
- FLV-LVPs - *fluvastatin - lipo-viro-particles complex*
- G- guanina

GGT - gama- glutamiltransferase
GSH - glutatíão reduzido
HBV - *hepatitis B virus*
HC - hepatite C
HCC - hepatite C crónica
HCV - *hepatitis C virus*
HDL(s) - lipoproteínas de alta densidade (do inglês, *high-density lipoprotein(s)*)
HepG2 - linhas celulares derivadas de carcinoma hepatocelular humano (do inglês, *human hepatocelular liver carcinoma cell line*)
Hh - *hedgehog*
HIV - *human immunodeficiency virus*
HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HOMA - modelo de avaliação da homeostase (do inglês, *homeostatic model assessment*)
IDU - consumo de drogas intravenosas (do inglês, *injection drug use*)
IFN- interferão (do inglês, *interferon*)
Ig - imunoglobulina
IL - interleucina
Ile - isoleucina
IMC - índice de massa corporal
IRES - local de entrada do ribossoma (do inglês, *internal ribosomal entry site*)
ISRS - inibidores selectivos da recaptação da serotonina
kb - kilobases
kDa - kilodalton
KM - *Michaelis constant*
l - litro
LDLR - receptor das lipoproteínas de baixa densidade (do inglês, *low-density lipoprotein receptor*)
LDL(s) - lipoproteínas de baixa densidade (do inglês, *low-density lipoprotein(s)*)
LDs - gotículas lipídicas (do inglês, *lipid droplets*)
Leu - leucina
L SIGN - *liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*
LVP(s) - partículas lipovirais (do inglês, *lipo-viro-particle(s)*)

MDA - malondialdeído
mg-miligrama
MgCl₂ - cloreto de magnésio
min - minuto(s)
ml - mililitro
mM - milimolar
mmol - milimole
mRNA - RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*)
NCR - região não codificante (do inglês, *non-coding region*)
NK - natural killer
NKT - natural killer T
nm - nanómetro
NR - não respondedor
OPN - osteopontina (do inglês, *osteopontin*)
OR - *odds ratio*
ORF - grelha de leitura (do inglês, *open reading frame*)
pb - par de bases
PCR-RFLP - reacção em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction*)
PDC - células dendríticas plasmocitóides (do inglês, *plasmacytoid dendritic cells*)
PM - metabolizador lento (do inglês, *poor metabolizer*)
pmol - picomole
RBV - ribavirina
RdRp - *RNA-dependent RNA polymerase*
RE - retículo endoplasmático
RI - resistência à insulina
RNA – ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
RR - resposta com recidiva
RS - resposta sustentada
s - segundos
SNP(s) - *single nucleotide polymorphism(s)*
SPP-1 - *specific secreted phosphoprotein-1*

SR-BI - *scavenger receptor class B type I*

TAE - Tris-Acetato-EDTA

T-bet - factor de transcrição T box expresso nas células T (do inglês, *transcription factor T-box-expressed-in-T-cells*)

TGF- β - *transforming growth factor- β*

Th (1)/ (2) - *T helper type (1)/ (2)*

TNF - factor de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

Tris-HCl - Tris-hidrocloreto

U - unidade

UV - radiação ultravioleta

VHB - vírus da hepatite B

VHC - vírus da hepatite C

VIH - vírus da imunodeficiência humana

VLDLs - lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês, *very low-density lipoproteins*)

$V_{\text{máx}}$ - velocidade máxima

μg - micrograma

μL - microlitro

μM - micromolar

Lista de Figuras

Figura 1 - Modelo estrutural e organização genómica do VHC.

Figura 2 - Ciclo de vida do VHC.

Figura 3 - Fisiopatologia da esteatose.

Figura 4 - Prevalência estimada da infecção pelo VHC por regiões da OMS.

Figura 5 - Distribuição mundial dos genótipos e subtipos do VHC.

Figura 6 - Marcadores de peso molecular.

Figura 7 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do OPN C8090T.

Figura 8 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do CYP2C9*2.

Figura 9 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do CYP2C9*3.

Figura 10 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do CYP2D6*4/*6.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse dos CYP2C9, CYP2D6 e OPN.

Tabela 2 - Condições de amplificação utilizadas no método de PCR para cada polimorfismo e mutação.

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizados na digestão dos fragmentos de interesse e genótipos possíveis.

Tabela 4 - Características demográficas e bioquímicas dos grupos de estudo e controlo.

Tabela 5 - Características demográficas e bioquímicas consoante a resposta à terapêutica.

Tabela 6 - Grau de esteatose consoante a resposta à terapêutica.

Tabela 7 - Estadio de fibrose consoante a resposta à terapêutica.

Tabela 8 - Genótipos do VHC dos diferentes tipos de respondedores.

Tabela 9 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos, antes e após a terapêutica, dos pacientes com resposta sustentada.

Tabela 10 - Estudo caso/controlo dos polimorfismos e mutação estudados.

Tabela 11 - Risco relativo para associação entre os genótipos da OPN e a susceptibilidade associada à HCC.

Tabela 12 - Grau de esteatose em indivíduos heterozigóticos e em portadores de outros genótipos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

Tabela 13 - Existência ou não de esteatose em indivíduos heterozigóticos e em portadores de outros genótipos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

Tabela 14 - Estadio de fibrose em indivíduos heterozigóticos e em portadores de outros genótipos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

3.1.1. Origem das amostras.....	31
3.1.2. Dimensão da amostra.....	31
3.2. Preparação das amostras de sangue	31
3.3. Extração de DNA genómico	31
3.4. Quantificação e determinação da pureza do DNA	31
3.5. Genotipagem dos CYP2C9/2D6 e OPN por PCR-RFLP	32
3.5.1. Condições de PCR-RFLP - CYP2C9/2D6.....	32
3.5.2. Condições de PCR-RFLP - OPN	34
3.6. Análise estatística	35
4. Resultados	36
4.1. Características dos pacientes	36
4.1.1. Características demográficas e bioquímicas	36
4.1.2. Características fisiopatológicas e resposta à terapêutica	37
4.2. Genotipagem dos CYP2C9/D6 e OPN	44
4.2.1. Identificação dos polimorfismos/mutação	44
4.2.1.1. Identificação do polimorfismo OPN C8090T	45
4.2.1.2. Identificação do polimorfismo CYP2C9*2	46
4.2.1.3. Identificação do polimorfismo CYP2C9*3	46
4.2.1.4. Identificação do polimorfismo/mutação CYP2D6*4/*6	47
4.2.2. Estudo caso/controlo dos polimorfismos/mutação	48
5. Discussão	53
5.1. Patogenia da HCC.....	53
5.2. Resposta à terapêutica na HCC	57
6. Conclusão	61
7. Bibliografia	63

1. Introdução

1.1. Vírus da hepatite C (VHC)

1.1.1. Classificação do VHC e variabilidade genética

O VHC é um vírus isocaédrico pertencente à família *Flaviviridae* e é o membro protótipo do género *Hepacivirus* (Griffin *et al.*, 2009; Pezacki *et al.*, 2010).

O genoma do VHC consiste numa molécula de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples e polaridade positiva, com aproximadamente 9,6 kb, composta por uma região 5' não codificante (5'-NCR); uma grelha de leitura (ORF), que codifica uma proteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos; e uma 3'-NCR (Burlone & Budkowsk, 2009; Moradpour *et al.*, 2007). A região 5'-NCR possui um local interno de entrada do ribossoma (IRES), responsável pela tradução da proteína viral, que é clivada co- e pós-traducionalmente em 3 proteínas estruturais (*core*, E1 e E2) e 7 não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B-RNA polimerase dependente do RNA (RdRp)), por proteases virais e do hospedeiro. As proteínas estruturais, com o genoma de RNA, e as p7 e NS2 formam as partículas virais, enquanto as proteínas não estruturais NS3 a NS5B estão envolvidas no metabolismo do hospedeiro e na replicação do RNA viral (Figura 1) (Appel *et al.*, 2006; Burlone & Budkowsk, 2009; Griffin *et al.*, 2009).

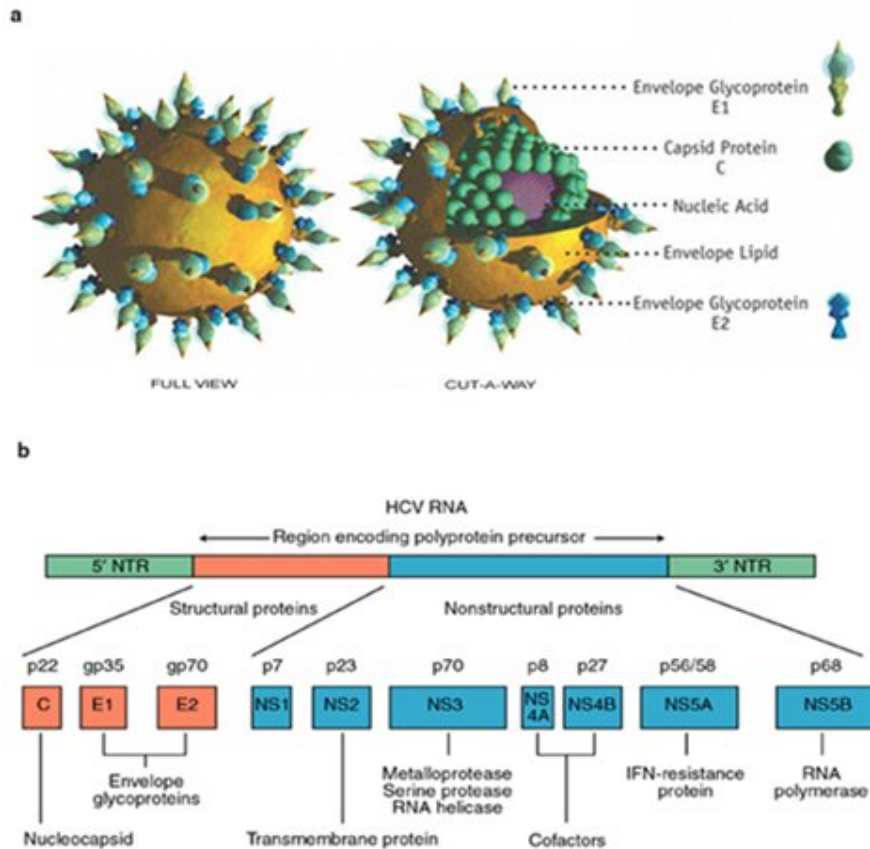


Figura 1 - Modelo estrutural (a) e organização genômica (b) do VHC (adaptado de Anzola & Burgos, 2003)

A infecção pelo VHC é um processo altamente dinâmico, e está associada a uma semi-vida viral de apenas algumas horas e uma produção e libertação de aproximadamente 10^{12} partículas virais por dia num indivíduo infectado. Esta elevada actividade replicativa, juntamente com a ausência do mecanismo de correcção de erros (função de *proof-reading*) da RdRp viral, são a base da elevada variabilidade genética do VHC (Moradpour *et al.*, 2007).

Os VHC isolados podem ser classificados em génotipos e subtipos. Existem 6 génotipos principais que diferem em média 30-35% na sua sequência nucleotídica, estando a maior variabilidade concentrada em regiões como as glicoproteínas E1 e E2, enquanto as sequências do gene do *core* e alguns genes de proteínas não estruturais, como a NS3, são mais conservadas. A menor variabilidade da sequência é encontrada na 5'-NCR, onde sequências específicas e estruturas secundárias de RNA são necessárias

para as funções de replicação e tradução (Moradpour *et al.*, 2007; Simmonds, 2004).

Dentro de um genótipo do VHC, podem ser definidos vários subtipos (designados por a, b, c, etc.) que diferem 20-25% na sua sequência nucleotídica. O termo quasiespécies refere-se à heterogeneidade da população de genomas do VHC que coexiste num indivíduo infectado (Moradpour *et al.*, 2007).

1.1.2. O VHC e o seu ciclo de vida

1.1.2.1. Estrutura do virião

As partículas virais infecciosas, de 40-70 nm de diâmetro, são constituídas por uma nucleocápside, que contém múltiplas cópias da proteína do *core* e RNA genómico; a estrutura interna está circundada por uma bicamada fosfolipídica, onde estão ancoradas as glicoproteínas E1 e E2. A proteína do *core* e as glicoproteínas do envelope E1 e E2 são consideradas os principais componentes proteicos do virião (Figura 1) (Burlone & Budkowsk, 2009; Moradpour *et al.*, 2007).

O VHC circula de várias formas no hospedeiro infectado, podendo estar associado a lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs), que representam a fracção infecciosa, podendo também circular como viriões ligados a imunoglobulinas e viriões livres (Moradpour *et al.*, 2007). Contudo, não é conhecida a natureza exacta desta associação (Burlone & Budkowsk, 2009).

1.1.2.2. Entrada do VHC na célula

Os únicos hospedeiros conhecidos susceptíveis à infecção pelo VHC são os humanos e os chimpanzés. Apesar de hepatotrófico, o VHC também é capaz de infectar as células do sistema imunitário, nomeadamente, os linfócitos CD4+ e CD8+, as células B e os monócitos (Burlone & Budkowsk, 2009; MacParland *et al.*, 2009; Moradpour *et al.*, 2007).

A entrada do vírus é definida como a etapa de ligação da partícula viral à superfície da célula do hospedeiro até à libertação do genoma viral para o seu local de replicação no interior das células alvo, que no caso do VHC, são os hepatócitos (Figura 2) (Moradpour *et al.*, 2007).

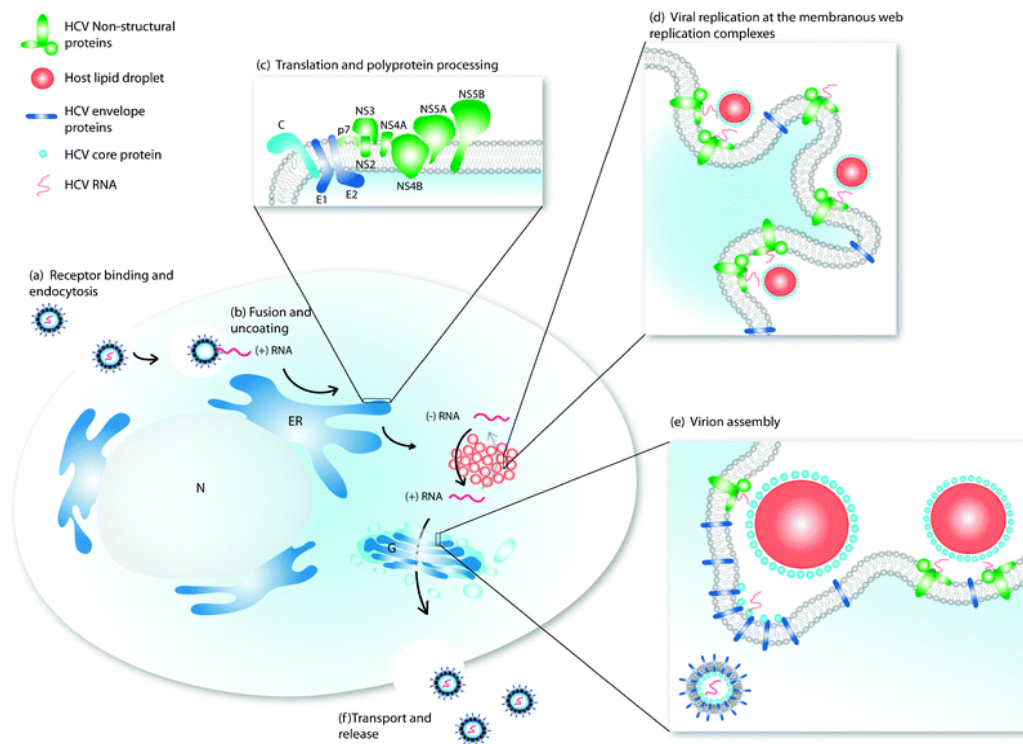


Figura 2 - Ciclo de vida do VHC: (a) Entrada das partículas virais do VHC por endocitose, mediada por uma cascata de interações com receptores da superfície das células; (b) após a entrada, o RNA viral é libertado e (c) dirige-se para os ribossomas, onde os polipéptidos do VHC são traduzidos e processados; (d) ocorre a replicação viral; (e) montagem; (f) maturação e libertação do virião (adaptado de Pezacki *et al.*, 2010).

Os potenciais receptores do VHC incluem, o receptor das LDL (LDLR), a tetraspanina humana CD81, o receptor SR-BI, as lectinas *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* (DC SIGN) e as suas homólogas *liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin* (L SIGN), o receptor da asialoglicoproteína (ASGPR), os glicosaminoglicanos e a claudina-1. O LDLR é um importante candidato devido à associação do VHC com as LDLs e VLDLs (Bartosch & Cosset, 2006; Moradpour *et al.*, 2007).

Na superfície da célula hospedeira, os glicosaminoglicanos (sulfato de heparano), o LDLR e outras moléculas envolvidas na ligação de lipoproteínas séricas e no metabolismo, podem mediar a sua interação inicial.

Posteriormente, o VHC entra por endocitose mediada pela clatrina com passagem através de um compartimento endossomal, de baixo pH e presumivelmente por fusão da membrana endossomal (Moradpour *et al.*, 2007; Tang & Gris , 2009).

A etapa seguinte envolve a descapsida o e liberta o dos componentes da partícula do virião, que inclui a cadeia positiva de RNA gen mico do VHC, algumas proteínas não estruturais e, em alguns casos, proteínas do hospedeiro, incluindo as LDL. O RNA viral dirige-se então para os ribossomas, onde os polipéptidos do VHC são traduzidos e processados (Burlone & Budkowsk, 2009; Dubuisson *et al.*, 2008; Pezacki *et al.*, 2010).

Após a matura o das proteínas individuais do VHC, o vírus provoca altera es nas membranas da célula hospedeira, resultando em redes membranares derivadas do reticulo endoplasmático (RE). Estas membranas alteradas tornam-se locais de replica o do VHC, que é realizada pela RdRp. As cadeias negativas de RNA são produzidas, servindo como moldes para a síntese das novas cadeias positivas de RNA gen mico (Pezacki *et al.*, 2010).

Os locais de replica o situam-se no RE, próximos do local de forma o das gotículas lipídicas (LDs) (Miyanari *et al.*, 2007; Moradpour *et al.*, 2007).

A montagem do vírus procede, sendo iniciada pela proteína do core do VHC, que interage fortemente com as LDs (Figura 2). Considera-se que, a montagem da partícula viral ocorre nas LDs junto ao RE, estando este processo em conjuga o com a síntese de partículas VLDL (Figura 2) (Gastaminza *et al.*, 2008).

1.2. Hepatite C crónica (HCC)

A infec o pelo VHC é a principal causa de hepatite C crónica (HCC), cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Moradpour *et al.*, 2007).

A infec o primária   predominantemente assintomática e a insuficiência hepática fulminante é rara neste contexto. O RNA do VHC presente no soro pode ser identificado 7-21 dias após a exposi o, pela reac o em cadeia da polimerase (PCR). Neste período ocorre um declínio no nível de virémia, registando-se uma subida do nível de transaminases séricas, alanina

aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A seroconversão ocorre normalmente após 2-8 semanas (Freeman *et al.*, 2001).

Durante o processo infeccioso é induzida tanto a resposta imunitária inata como a adaptativa, permitindo que a eliminação natural do vírus ocorra em 20-30% dos pacientes com hepatite aguda. Contudo, em 70-80% dos casos a infecção persiste, estando normalmente associada a lesões hepáticas crônicas progressivas (HCC) (Freeman *et al.*, 2001; Negro, 2010; Tardif *et al.*, 2005).

A maioria dos pacientes com VHC persistente apresenta evidências bioquímicas e histológicas de hepatite, tipicamente assintomáticas, ou fadiga ligeira. A HCC pode desencadear um espectro de manifestações clínicas nas quais se incluem a esteatose, a fibrose, a cirrose e o carcinoma hepatocelular (Tardif *et al.*, 2005).

Aproximadamente 20% dos indivíduos infectados pelo VHC desenvolvem cirrose após um período médio de 20 anos, e 1-4% destes podem, eventualmente, desenvolver carcinoma hepatocelular, em média 30 anos após a infecção (Raimondi *et al.*, 2009).

A progressão habitual da doença hepática em pacientes com HCC resulta num processo de inflamação acompanhado por necrose periportal e fibrose (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A inflamação provocada pelo vírus é responsável pela estimulação das células estreladas, resultando na deposição de fibras de colagénio e consequente, fibrose hepática. Através de um aumento de citocinas inflamatórias e de um efeito citopático directo, as células T induzem a apoptose dos hepatócitos (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

Contudo, o espectro de gravidade é bastante variável, assim como, a progressão para a cirrose hepática. Esta heterogeneidade depende essencialmente de factores do hospedeiro e ambientais, embora a contribuição das características do vírus, como o tipo de genótipo, tenha actualmente adquirido maior importância (Negro, 2010).

Relativamente ao genótipo do vírus, o genótipo 1b está associado a um maior risco no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, sendo maior o risco nos estadios mais precoces de doença hepática quando comparado a indivíduos com cirrose hepática (Raimondi *et al.*, 2009).

Os co-factores que influenciam a gravidade e progressão da HCC, incluem idade avançada, género masculino, co-infecções com outros vírus hepatotrópicos, vírus da hepatite B (VHB) e/ou vírus da imunodeficiência humana (VIH), consumo excessivo de álcool, tabagismo, cirrose hepática, estadio avançado de fibrose, elevado *score* de actividade histológica, elevados níveis séricos de ALT e AST, e também, síndrome metabólica (Negro, 2010; Raimondi *et al.*, 2009).

1.3. Esteatose - o metabolismo dos lípidos

A esteatose hepática, ou fígado gordo, é definida como uma acumulação excessiva de lípidos no citoplasma das células hepáticas, sendo reconhecida como uma causa significativa de fibrose/cirrose (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011).

A prevalência de esteatose hepática é mais frequente em pacientes com HCC do que na população em geral onde se estima afectar 20% a 30% dos adultos (Asselah *et al.*, 2003).

Em pacientes com HCC, a prevalência de esteatose varia entre 40% e 80%, dependendo do consumo de álcool, excesso de peso, diabetes *mellitus* (DM) e outros factores de risco (Negro, 2010).

A associação patogénica entre a infecção VHC e a esteatose hepática é, portanto, uma condição multifactorial (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

Podem co-existir dois tipos de esteatose, a esteatose induzida pelo vírus e a esteatose metabólica associada ao hospedeiro (Brunt & Tiniakos, 2001; Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A esteatose metabólica, consequência da disfunção mitocondrial envolvida no processo de β -oxidação dos ácidos gordos, está relacionada com factores de risco como a obesidade, a dislipidémia e a síndrome metabólica. Este tipo de esteatose, em pacientes com HCC, é normalmente independente do genótipo do VHC. Nestes pacientes existem vários factores associados à esteatose hepática, incluindo o consumo de álcool, idade avançada, elevado índice de massa corporal (IMC), obesidade e dislipidémia ou diabetes *mellitus* (DM). (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A resistência à insulina (RI) e a DM têm um papel chave no desenvolvimento de esteatose hepática e de esteato-hepatite, em pacientes infectados pelo VHC, particularmente nos infectados com o vírus de genótipo não-3. A DM aumenta o risco de contrair esta infecção (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A esteatose metabólica não é induzida pelo VHC, mas a combinação desta com a presença do vírus está associada a uma progressão acelerada para fibrose (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A RI resulta em alterações no metabolismo dos lípidos (lipólise periférica, aumento da síntese de triglicéridos, aumento da absorção hepática de ácidos gordos), podendo contribuir para a acumulação de triglicéridos hepatocelulares (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009; Sanyal *et al.*, 2001). A excessiva acumulação de lípidos no fígado está sujeita ao ataque pelas espécies reactivas de oxigénio (EROs), levando à peroxidação lipídica (Ciriolo *et al.*, 1997; Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A RI tem dois mecanismos principais: a lipólise e a hiperinsulinémia. A lipólise aumenta os ácidos gordos circulantes. O aumento da absorção de ácidos gordos pelos hepatócitos leva a uma sobrecarga da β -oxidação mitocondrial, com a consequente acumulação de ácidos gordos nos hepatócitos (Angulo, 2002). A hiperinsulinémia resultante da RI aumenta a síntese de ácidos gordos nos hepatócitos acompanhada pela diminuição da produção hepática da apolipoproteína B-100 (apoB-100). Os ácidos gordos hepáticos são normalmente esterificados em triglicéridos, alguns dos quais são exportados para fora dos hepatócitos como VLDLs. O nível aumentado de lípidos, principalmente na forma de triglicéridos nos hepatócitos, resulta num desequilíbrio entre os sistemas enzimáticos que promovem a absorção e síntese de ácidos gordos, levando à oxidação e exportação de ácidos gordos (Figura 3) (Asselah *et al.*, 2003; Sanyal *et al.*, 2001).

A associação entre a RI e a esteatose é bastante importante dado o risco acumulado para fibrose e a diminuição da resposta virológica à terapêutica antiviral (Letteron *et al.*, 1996).

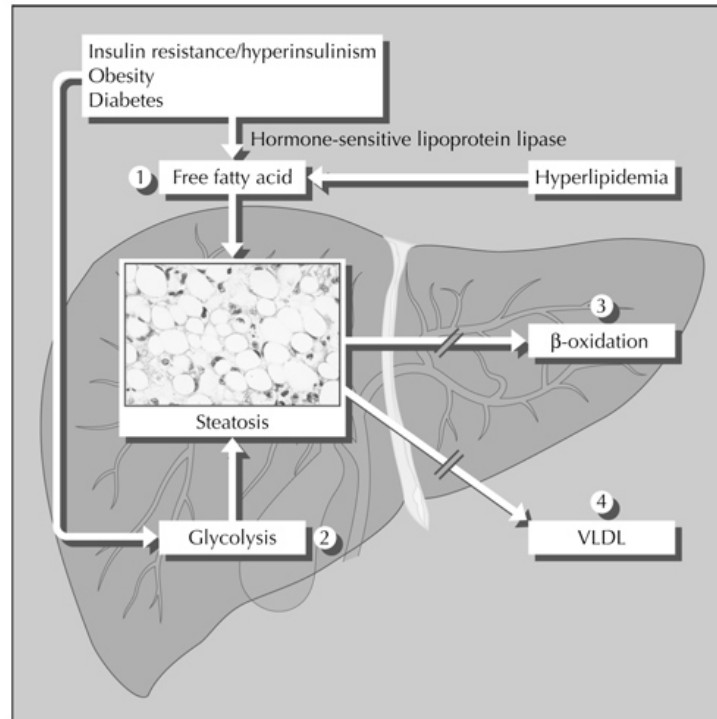


Figura 3 - Fisiopatologia da esteatose. A acumulação de ácidos gordos no fígado resulta principalmente de quatro causas: 1) aumento da absorção hepática de ácidos gordos; 2) aumento da glicólise; 3) diminuição da eliminação de ácidos gordos devido à diminuição da β -oxidação; e 4) diminuição da exportação de ácidos gordos ligados a apoB-100 como VLDL (adaptado de Asselah *et al.*, 2003).

Na HCC, a fibrose/cirrose hepática e a inflamação estão associadas com o aumento da produção de EROs (Farinati *et al.*, 1999). Este stress oxidante induz lesões hepáticas e peroxidação lipídica das membranas, com formação de malonaldeído (MDA) e depleção de glutatono reduzido (GSH) (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A progressão para fibrose pode ocorrer através de mecanismos não inflamatórios: peroxidação lipídica induzida pelo VHC, aumento da produção de radicais livres, activação secundária das células estreladas e produção de colagénio (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

Em pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC, o stress oxidativo e a resistência à insulina (RI) contribuem para a ocorrência de esteatose, que por sua vez agrava a resistência à insulina e o stress oxidativo e acelera a progressão da fibrose. Em contraste, em pacientes infectados pelo genótipo 3 do VHC, a esteatose é induzida principalmente por efeitos citopáticos directos do vírus (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011).

A esteatose é mais frequente e mais grave em pacientes infectados com o genótipo 3 do VHC, que estará directamente envolvido na acumulação de triglicéridos nos hepatócitos (esteatose “viral”). Esta interpretação resulta do facto da gravidade da esteatose se correlacionar com o nível de replicação viral, e o fígado gordo diminuir significativamente ou mesmo desaparecer quando os pacientes são tratados com sucesso com antivirais (Negro, 2006).

Assim, a gravidade da esteatose está directamente relacionada com a carga viral (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

1.4. Resposta imunitária

A resposta imunitária do hospedeiro à infecção pelo VHC consiste numa resposta imunitária não específica, que inclui a produção de interferão (IFN) e a actividade das células *natural killer* (NK), assim como numa resposta imunitária específica do vírus com componentes humorais e celulares. A depuração espontânea da infecção pelo VHC, que ocorre em cerca de 20% dos indivíduos infectados agudamente, está associada com uma resposta imunitária celular amplamente específica e vigorosa (Teixeira *et al.*, 2007).

A resposta imunitária celular parece desempenhar um papel nos efeitos virológicos, durante a infecção aguda, baseado numa forte associação da resposta vigorosa sustentada e antiviral multiespecífica das células T CD4+ e CD8+, com eliminação do vírus (Teixeira *et al.*, 2007).

A principal função das células T CD4+ é a função reguladora, através da modulação da actividade de células B antígeno-específicas, perfil *T helper type 2* (Th2), e das respostas das células T CD8+, perfil *T helper type 1* (Th1), através da secreção de linfocinas (Gremion & Cerny, 2005).

As células T CD8+ são importantes na eliminação viral através da utilização da morte directa das células infectadas e mecanismos não

citotóxicos, tais como, a secreção de citocinas antivirais (IFN- γ ou factor de necrose tumoral- α (TNF- α)) (Gremion & Cerny, 2005).

Após a depuração, a resposta vigorosa das células T CD4+ contra o VHC é mantida por vários anos, enquanto a resposta das células T memória CD8+ pode ser mantida com eficiência variável (Chang, 2003).

Nos pacientes que progridem para a infecção crónica estabelecida, desconhece-se a razão pela qual a resposta inicial falha no controlo da virémia. As respostas imunitárias relativas à fase aguda têm-se apresentado diminuídas ou quantitativamente fracas em alguns indivíduos que permanecem infectados persistentemente, sendo a infecção crónica caracterizada por baixas frequências de células T CD8+ em sangue periférico (Teixeira *et al.*, 2007).

Embora o fígado tenha o potencial para eliminar respostas das células T antígeno-específicas, têm sido produzidas linhas de células T CD8+ específicas do VHC a partir de fígado de humanos e chimpanzés infectados cronicamente, sugerindo que a eliminação dos linfócitos específicos do VHC do fígado não é universal nem necessária para a persistência do vírus (Crispe, 2003; Erickson *et al.*, 1993; Koziel *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1998).

Então, a sobrevivência do VHC, apesar das células T CD8+ específicas do vírus, pode ser devida a funções celulares efectoras debilitadas (proliferação, secreção de citocinas, actividade citolítica), exaustão de células T, ou disfunção de células dendríticas. A persistência do VHC pode estar facilitada principalmente pela evolução viral ao longo da infecção (Teixeira *et al.*, 2007).

Em pacientes com HCC têm sido registadas anomalias na imunidade humoral, destacando-se um aumento nos isótipos séricos da imunoglobulina (Ig), IgG, e as suas subclasses IgG1 e IgM (El-Kady, 2004).

Estudos recentes que destacam a interacção funcional mútua entre as células NK, células dendríticas e células T têm conduzido a uma reavaliação do papel importante desempenhado pelas células NK na regulação e manutenção das respostas imunitárias, colocando-as no centro das estratégias imunitárias de resposta (Golden-Mason *et al.*, 2006).

As células NK são células efectoras antivirais importantes contra o VHC através da morte directa e produção de citocinas. Estas células são necessárias para a função citolítica das células T específicas do vírus, tendo

também a capacidade de induzir directamente a apoptose de hepatócitos infectados pelo vírus (Teixeira *et al.*, 2007).

Vários estudos sugerem que a persistência do VHC pode estar associada a respostas deficientes das células NK *in vivo* na periferia do/e no fígado. Um estudo sugeriu que as diferenças existentes nas células NK, na resolução da infecção da HCC, poderiam ser controladas geneticamente até um certo ponto (Teixeira *et al.*, 2007).

Como muitos outros vírus, o VHC tem desenvolvido estratégias para evitar a sua detecção e eliminação por estas células (Golden-Mason *et al.*, 2006). Evidências clínicas demonstram que pacientes infectados, com funções imunitárias suprimidas e baixa actividade das células NK, apresentam uma progressão acelerada da fibrose hepática (Teixeira *et al.*, 2007). Adicionalmente, as células NK desempenham papéis importantes na supressão da fibrose hepática em humanos quando activadas pelos IFN- α ou IFN- γ (Gao, 2005; Safdar & Schiff, 2004). Os estimuladores da actividade das células NK, tais como terapêuticas com IFN- α e IFN- γ , podem ter efeitos benéficos não só na eliminação do vírus, mas também na supressão da fibrose hepática. Em conjunto, estes estudos sugerem fortemente que a falência na eliminação do VHC pode resultar da função debilitada das células NK (Teixeira *et al.*, 2007).

1.4.1. Contribuição genética da osteopontina

A osteopontina (OPN) humana é um polipéptido de cadeia simples (314 aminoácidos) com um peso molecular de aproximadamente 32 kDa, o seu gene tem sete exões e localiza-se no cromossoma quatro (4q21-q25) (Okamoto, 2007).

A OPN, também denominada *early T lymphocyte Activation* (Eta-1), é uma fosfoproteína 1 secretada (SPP-1, *specific secreted phosphoprotein-1*) não colagenosa da matriz celular, que está envolvida na patogénese de várias doenças inflamatórias e fibróticas. A OPN compreende múltiplos domínios funcionais, com um alto teor de ácido siálico, um domínio rico em aspartato, um domínio de ligação ao cálcio, um local de clivagem pela trombina e muitos resíduos com consenso para a fosforilação, tais como uma sequência de ligação à integrina RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que desempenha um

papel chave em várias doenças inflamatórias (Honsawek *et al.*, 2010; Lorena *et al.*, 2006; Okamoto, 2007).

A OPN é uma glicoproteína ácida fosforilada produzida ou secretada pelos osteoblastos, osteoclastos, macrófagos, células T, células NKT (*natural killer T*), células hematopoiéticas, fibroblastos, células do miocárdio, e outros tipos de células (Honsawek *et al.*, 2010; Hummelshoj *et al.*, 2006; Okamoto, 2007). Possui funções de citocina pró-inflamatória e quimiocina na imunidade celular e está envolvida em vários acontecimentos patológicos e fisiológicos, tais como, adesão celular, proliferação, migração ou infiltração celular, inflamação, inibição da apoptose, remodelação vascular, cicatrização de feridas, e reconstituição das matrizes extracelulares (ECMs) na metástase tumoral. A OPN induz a acumulação das ECMs através da ligação ao colagénio tipo 1, fibronectina e à osteocalcina, contribuindo para a fibrose dos tecidos (Honsawek *et al.*, 2010; Okamoto, 2007; Renkl *et al.*, 2005).

Também estimula a proliferação das células T e induz as células T e os macrófagos a expressar outras citocinas Th1 durante a inflamação (Honsawek *et al.*, 2010). A OPN converte a polaridade das células T a tipo Th1. A OPN está envolvida no aparecimento de doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide e doenças granulomatosas incluindo a sarcoidose (Hummelshoj *et al.*, 2006).

O factor de transcrição T box expresso nas células T (T-bet) é o principal coordenador da expressão de genes das células T que iniciam a imunidade tipo 1 e é essencial para a polarização em células Th1 (Miossec *et al.*, 2009). Isto é fundamental para a expressão de OPN nas células dendríticas plasmocitóides (PDC) e regula a expressão de OPN nos linfócitos (Diao *et al.*, 2008; Szabo & Dolganiuc, 2006). A expressão de OPN dependente do T-bet é essencial para o desenvolvimento da polarização de T CD4+ e T CD8+, Th1 e Tc1 respectivamente. Existem locais de transactivação para T-bet na região promotora do gene da OPN (Szabo *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2002; Szabo *et al.*, 2003).

A OPN promove o fenótipo Th1 e inibe as respostas Th2 (Xanthou *et al.*, 2007). Alguns factores como a presença de grupos fosfato ou o tipo de estímulo antigénico (primário ou secundário) influencia este efeito (Shinohara *et al.*, 2006; Xanthou *et al.*, 2007).

A OPN tem sido associada a vários tipos de cancro, como na progressão do carcinoma hepatocelular, e também em doenças com excessiva polarização Th1, tais como, esclerose múltipla, artrite reumatóide, fibrose pulmonar (Kramer *et al.*, 2005; Renkl *et al.*, 2005; Serlin *et al.*, 2006), doença de Crohn (Sato *et al.*, 2005), cirrose biliar primária (Panoutsakopoulou *et al.*, 2001), hepatite alcoólica (Ramaiah & Rittling, 2008) e resposta à terapêutica da HC (Naito *et al.*, 2005), eliminação do VHB e/ou ocorrência de HCC (Shin *et al.*, 2007).

A OPN medeia a inflamação e a carcinogénese. A sua expressão está aumentada em obesos e correlaciona-se com a resistência à insulina e esteatose. A OPN desencadeia a fibrogénese; efeito demonstrado *in vitro*, em modelos animais *in vivo*, e em doenças hepáticas humanas. A activação das células estreladas hepáticas está associada com o aumento da regulação da OPN; adicionalmente, a incubação destas com OPN induz efeitos migratórios e proliferativos como a produção de colagénio e aumento da regulação do receptor do factor de transformação de crescimento- β (TGF- β). Na hepatite viral, a OPN correlaciona-se com a fibrose e o risco e gravidade da cirrose hepática. Está também ligada à indução de células ovais e carcinogénese hepática e está associada com redução da sobrevivência em indivíduos com carcinoma hepatocelular (Machado & Cortez-Pinto, 2011).

Em indivíduos com esteato-hepatite não alcoólica, os hepatócitos sofrem apoptose, e como a sua capacidade regenerativa é afectada, produzem o ligante *hedgehog* (Hh), que actua na via parácrina, nas células ovais e estreladas: a proliferação das células ovais é a base da regeneração, e a activação das células estreladas nos miofibroblastos é a base da fibrogénese; assim, a regeneração e fibrogénese progridem lado a lado. A OPN tem sido associada à fibrose e cirrose avançada (carcinogénese hepatocelular), o que pode indicar uma reparação e resposta regenerativa desreguladas (Machado & Cortez-Pinto, 2011).

A expressão da OPN é aumentada em resposta a stress ou lesão de tecidos, evidenciando um papel importante na regulação da inflamação, remodelação de tecidos, e sobrevivência celular. A OPN é expressa pelas células do epitélio biliar no fígado humano normal. A sua expressão é aumentada no fígado durante inflamação aguda, principalmente nos macrófagos (Lorena *et al.*, 2006).

A administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) mostrou aumentar a expressão de OPN em fígado de ratinhos (Kawashima *et al.*, 1999; Lorena *et al.*, 2006). OPN recombinante também activou a migração *in vitro* de macrófagos hepáticos de rato, enquanto *in vivo*, os níveis de infiltração dos macrófagos no fígado lesado foram reduzidos em ratinhos *knockout* do gene da OPN (Kawashima *et al.*, 1999). Estas descobertas indicam que a OPN pode estar envolvida na iniciação de reacções inflamatórias no fígado e activação da fibrose hepática (Honsawek *et al.*, 2010).

Relativamente à HCC, existem poucos dados sobre o papel da OPN nesta patologia. Polimorfismos genéticos na região promotora (nt-443) foram relacionados com a actividade histológica e a resposta à terapêutica (Mochida *et al.*, 2004; Naito *et al.*, 2005). Neste sentido, seria interessante analisar o efeito do polimorfismo C8090T da região codificante do gene da OPN, que é também um factor do hospedeiro, na HCC.

1.5. Epidemiologia e variabilidade genética do VHC

O vírus da hepatite C (VHC), identificado em 1989, afecta aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo uma prevalência global de 3%. Em Portugal estima-se que aproximadamente 150 mil pessoas sejam portadoras do VHC (Hwang *et al.*, 2011; Marinho *et al.*, 2001; Tang & Grisé, 2009).

Apesar de endémico em todo o mundo, o VHC apresenta uma grande variabilidade na sua distribuição geográfica (Figura 4). Os países com maiores taxas de prevalência localizam-se na Ásia e em África; as áreas com menor prevalência incluem os países industrializados da América do Norte, Europa do Norte e Ocidental, e Austrália (Shepard *et al.*, 2005).

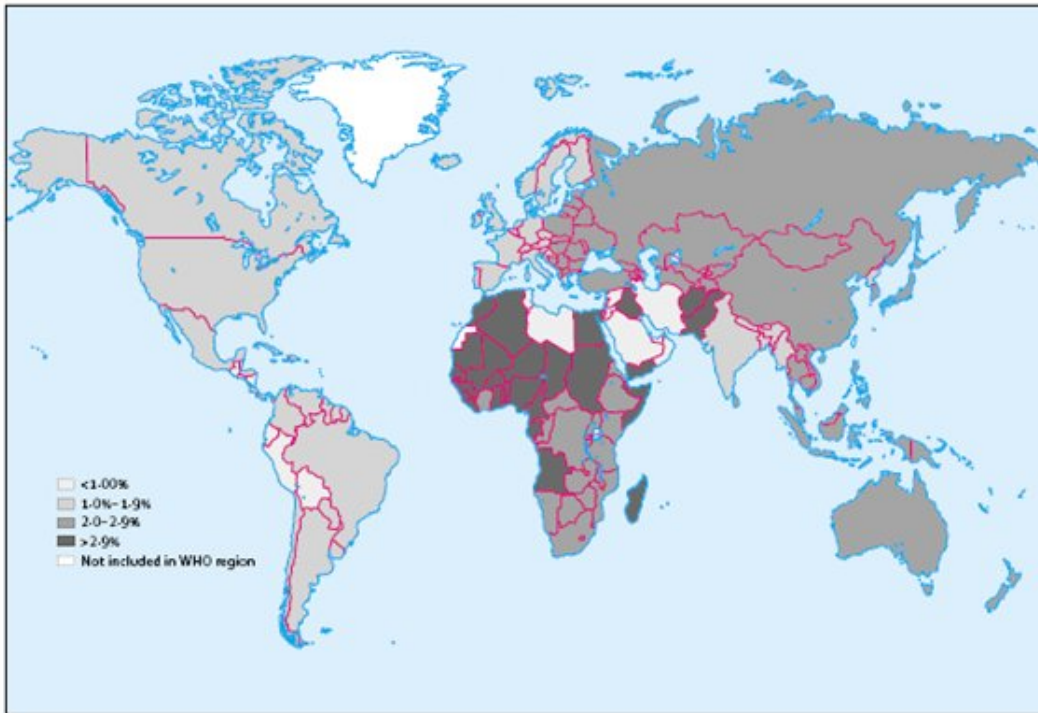


Figura 4 - Prevalência estimada da infecção pelo VHC por regiões da OMS (adaptado de Shepard *et al.*, 2005).

Os principais factores de risco, responsáveis pela transmissão do VHC em todo o mundo, são transfusões sanguíneas de dadores não seleccionados, consumo de drogas intravenosas (IDU), injeções terapêuticas inseguras, e outras práticas relacionadas com os cuidados de saúde, como procedimentos médicos invasivos e cirúrgicos (Esteban *et al.*, 2008; Shepard *et al.*, 2005).

Nos países mais desenvolvidos a fonte predominante de novas infecções pelo VHC, dentro das suas fronteiras e nas últimas décadas, é o uso de drogas injectáveis. No mundo em desenvolvimento, as injeções terapêuticas e as transfusões são provavelmente os principais modos de transmissão, especialmente em países onde as taxas de seroprevalência específicas por idade apontam para um maior risco contínuo da infecção. Nos países desenvolvidos com elevada seroprevalência nos grupos etários mais velhos, as injeções terapêuticas tiveram um papel importante na transmissão do VHC há 30-50 anos atrás, e podem persistir como uma importante causa em regiões isoladas, hiperendémicas (Shepard *et al.*, 2005).

Vários cofactores têm sido associados à progressão acelerada da fibrose hepática entre os infectados com VHC, ou com o aumento da incidência de

complicações da doença hepática crónica e carcinoma hepatocelular, relacionadas com o vírus. Nestes cofactores incluem-se o sexo masculino, idade avançada aquando a aquisição da infecção pelo VHC, obesidade, co-infecção pelo VIH e/ou VHB, e consumo de álcool (Shepard, 2005).

Apesar do número limitado de estudos populacionais baseados na prevalência da infecção, específica por idade, foram identificados três padrões de transmissão na Europa (Esteban *et al.*, 2008).

No Norte da Europa a epidemia foi transmitida principalmente pelo consumo de drogas intravenosas (IDU). Com uma prevalência global entre 0,1 e 1, nestes países as infecções mais prevalentes registam-se entre os indivíduos com 30-50 anos de idade. Na Europa Central, a prevalência do VHC é intermédia, variando de 0,2% na Holanda a 1,2 em França. No Sul da Europa, a prevalência global varia entre 2,5% e 3%. Nos países de Leste os dados epidemiológicos da população em geral são limitados. A incidência de HC aguda estava a aumentar em meados dos anos 90 entre indivíduos com 15-29 anos, como resultado da epidemia do IDU em vários países de Leste (Esteban *et al.*, 2008).

Os seis genótipos do VHC têm diferentes distribuições geográficas. Enquanto algumas variantes estão distribuídas por todo o mundo, outras estão limitadas a regiões geográficas específicas (Figura 5) (Webster *et al.*, 2000).



Figura 5 – Distribuição mundial dos genótipos e subtipos do VHC (adaptado de Webster *et al.*, 2000).

Os genótipos 1a, 1b e 3a do VHC são altamente prevalentes (“epidemia”), estando presentes em todo o mundo. Estas variantes difundiram-se rapidamente pelo mundo nos últimos 30-70 anos, como resultado da transmissão através de sangue e derivados de sangue infectados e IDU, e actualmente representam a grande maioria das infecções nos países ocidentais. Contrariamente a estas variantes, com níveis de variação genética relativamente baixos, existem outras altamente divergentes mas que estão presentes em áreas geográficas restritas, variantes “endémicas” (Simmonds, 2004; Verbeeck, 2006).

Os genótipos 1, 2 e 4 são endémicos nas regiões da África Ocidental e Central e Médio Oriente, enquanto as variantes endémicas divergentes dos genótipos 3 e 6 são encontrados no Sudeste Asiático. Em contraste com as outras variantes do VHC, a origem, a fonte endémica, e a disseminação da epidemia do genótipo 5a são desconhecidos. Esta variante considerada como restrita ao Sul de África, tem sido endémica em áreas isoladas da região Central de França e Oeste da Flandres. Também pode estar presente, esporadicamente, noutros locais como Austrália, Brasil, Canadá, Irlanda, Holanda e Espanha. Em 2004, registou-se, na região Central de França, uma elevada prevalência deste genótipo do VHC (Verbeeck, 2006).

A distribuição dos genótipos foi associada com o modo de transmissão, estando os subtipos 1a, 3a e 4 relacionados principalmente com o IDU e os genótipos 1b e 2 com as transfusões de sangue e práticas médicas inseguras (Esteban *et al.*, 2008).

A frequência relativa dos genótipos do VHC nas populações não é estática, e pode reflectir mudanças nos grupos populacionais, na idade aquando a infecção e na rota de transmissão (Webster *et al.*, 2000).

1.6. Terapêutica

As opções terapêuticas para a HCC são limitadas e não está disponível uma vacina eficaz para o vírus (Moradpour *et al.*, 2007; Tardif *et al.*, 2005).

A terapêutica padrão actual, baseada na combinação do IFN- α peguillado com ribavirina (RBV), durante 24 a 48 semanas, apresenta uma taxa de resposta virológica sustentada (RS) de 44-54%, variando amplamente consoante o genótipo, etnicidade e histologia subjacente (Burlone & Budkowska, 2009; Forde *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011; Negro, 2010; Walsh *et al.*, 2006).

A taxa de resposta virológica sustentada é definida como a ausência de RNA do VHC, confirmada por um ensaio sensível (limite inferior de detecção de <50 IU/mL), após 24 semanas a seguir ao final da terapêutica (Wohnsland *et al.*, 2007).

Apesar de uma melhoria na eficácia da terapêutica antiviral, nos últimos anos, na prática a taxa de resposta ao tratamento é de 20% para o genótipo 1 e de 43-52% para os genótipos 2 e 3 (Burlone & Budkowska, 2009; Forde *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011; Negro, 2010; Walsh *et al.*, 2006; Wohnsland *et al.*, 2007).

Uma vez que, as infecções com os genótipos 5a e 6a do VHC são menos frequentes, as respostas à terapêutica para estes genótipos são pouco conhecidas (Verbeeck, 2006).

Para além do genótipo do VHC e carga viral, existem vários factores genéticos e biológicos do hospedeiro que intervêm na resistência à terapêutica com IFN- α . Estes factores relacionados com o hospedeiro incluem sexo, idade, étnia, e variação genética em antigénios leucocitários humanos e na produção de citocinas. Além disso, indivíduos com fibrose num estadio avançado apresentam uma diminuição da resposta à terapêutica antiviral (Walsh *et al.*, 2006).

Contudo, os efeitos adversos e as contra-indicações da terapêutica limitam a sua aplicabilidade e utilização. Como consequência, o número de pacientes com sequelas da HCC, a longo prazo, incluindo o carcinoma hepatocelular, tende a aumentar nos próximos 20 anos (Moradpour *et al.*, 2007).

A compreensão da influência das proteínas do VHC e da replicação nos organelos e proteínas celulares irá permitir o desenvolvimento de novas terapêuticas anti-virais (Tardif *et al.*, 2005).

1.6.1. Novas perspectivas terapêuticas

1.6.1.1. Associação do IFN- α com fluvastatina

Em estudos *in vitro*, utilizando a versão replicação do VHC, as estatinas, inibidores do hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductase, têm apresentado um potencial papel terapêutico na infecção crónica pelo VHC (Bader *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2009). As estatinas são utilizadas amplamente para reduzir o risco de problemas cardiovasculares e mortalidade (Neuvonen *et al.*, 2008).

Estes estudos baseiam-se em observações do ciclo de vida do VHC: os viriões circulam no plasma associados a partículas LDL; o LDLR e o SR-BI das HDLs facilitam putativamente a entrada do vírus nos hepatócitos; e a replicação do VHC depende da formação de um complexo de replicação em “rede membranosa” (Bader *et al.*, 2008; Negro, 2010).

No interior deste complexo de replicação baseado no RE, existem proteínas do hospedeiro intimamente associadas a proteínas não estruturais do VHC. O processo que liga estas proteínas do hospedeiro e do VHC, designado por prenilação, parece depender de dois produtos proteicos da via de síntese do colesterol, o farnesil e o geranylgeraniol. A prenilação é um processo essencial para a formação da membrana celular, e um mecanismo bioquímico que o VHC, aparentemente, não tem codificado no seu genoma, devendo, portanto ser “emprestado” pela célula hospedeira (Bader *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2003).

As estatinas inibem o HMG-CoA reductase, levando à redução do mevalonato intracelular. Esta inibição, para além de diminuir as LDLs, leva a uma redução no geranylgeraniol, conduzindo à redução das proteínas intracelulares preniladas (Bader *et al.*, 2008).

Assim, as estatinas, agentes que bloqueiam a formação de precursores lipídicos para a prenilação, podem teoricamente interferir com a replicação viral (Ye *et al.*, 2003).

Bader *et al.* (2008) sugerem que a fluvastatina (FLV), uma das estatinas mais utilizadas, actua no plasma circulante ligada a partículas lipovirais (LVPs) que consistem em LDLs, VLDLs e lipoproteínas apoB. O resultado da ligação FLV-LVPs poderá interferir directamente com o que se especula ser a capacidade do vírus em modular o sistema imunitário do hospedeiro. O complexo FLV-LVPs poderá também apresentar maior dificuldade em entrar nos hepatócitos pelo LDLR, levando à redução da carga viral. No hepatócito, pensa-se que a fluvastatina se liga aos “rafts” lipídicos, possíveis locais de replicação dentro da célula (Badder *et al.*, 2008).

A associação do IFN- α com fluvastatina em modelos experimentais exibiu fortes efeitos sinérgicos na inibição da replicação do RNA viral, sugerindo que a FLV, em particular, mas potencialmente outras estatinas, poderão ser usadas como um adjuvante à terapêutica baseada no IFN- α (Badder *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2006).

1.6.1.2. Terapêutica tripla

Actualmente, existem novas terapêuticas medicamentosas que actuam directamente contra a replicação do VHC, tais como, inibidores de protease e polimerase, designados por DAAs (direct-acting antivirals) (Asselah *et al.*, 2009). A combinação de DAAs tem como objectivo aumentar a eficácia antiviral, diminuir a resistência e a toxicidade grave (Asselah & Marcellin, 2011).

Em pacientes portadores do genótipo 1 do VHC, têm sido divulgados resultados promissores quando o inibidor de protease telaprevir ou boceprevir é adicionado à terapêutica padrão. O telaprevir parece ser eficaz quando administrado com IFN- α 2a ou 2b peguilado. Contudo, com a adição de um inibidor de protease ao IFN peguilado e RBV, as taxas de resposta virológica sustentada (RS) aumentam de menos de 50% para 70%, em pacientes com o genótipo 1 (Asselah & Marcellin, 2011).

Com a disponibilização de várias DAAs, as estratégias terapêuticas tendem a incluir uma combinação de várias drogas com diferentes mecanismos de acção (inibidores de protease e inibidores de polimerase).

Actualmente, estão disponíveis combinações de antivirais com potência aditiva, às quais são atribuídos bons perfis de segurança e a inexistência de resistência cruzada. Contudo, estas opções terapêuticas são bastante mais

dispendiosas que a terapêutica padrão, e têm acopladas mais contra-indicações (Asselah & Marcellin, 2011).

1.7. Farmacogenética

A farmacogenética define-se como a área científica que relaciona a componente genética do indivíduo com a variação na resposta à terapêutica. A farmacogenética considera o impacto da variação genética nos alvos terapêuticos, como os receptores, mas também nos enzimas e proteínas transportadoras que influenciam a farmacocinética das drogas. Assim, ambos os factores farmacodinâmicos e farmacocinéticos podem conter variantes alélicas que influenciam a resposta terapêutica (Crettol *et al.*, 2010).

O estudo de polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadores de drogas é de grande importância para a compreensão da variabilidade nas respostas dos pacientes à terapêutica, embora nem toda a variabilidade tenha uma base genética. Outros factores como a idade, uso concomitante de drogas, situações relacionadas com a saúde (alergias, tabagismo), peso, dieta e outras co-morbilidades também influenciam a eficácia da droga. Assim, a capacidade metabólica de drogas depende tanto do genótipo como do fenótipo (Crettol *et al.*, 2010).

1.7.1. Enzimas do citocromo P450 (CYPs)

Os enzimas do complexo do citocromo P450 (CYP450) são assim denominados porque estão ligados às membranas de uma célula (cito) e contêm um pigmento heme (cromo e P) que absorve a luz num comprimento de onda de 450 nm quando expostos ao monóxido de carbono (Lynch, T. & Price, A. 2007).

Estes enzimas são agrupados em famílias (designadas por números árabes) e subfamílias (designadas por letras), baseadas no princípio que “uma sequência da proteína P450 de uma família de genes é definida como tendo normalmente <40% de semelhanças com outra família”. As subfamílias agrupam proteínas com <60% de semelhança na sequência (Hasler *et al.*, 1999).

Existem mais de 50 enzimas do CYP450, mas os enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, e o CYP3A5 metabolizam 90% das drogas. Estes CYPs são predominantemente expressos no fígado, mas também se encontram no intestino delgado (reduzindo a biodisponibilidade da droga), pulmões, placenta, e rins (Crettol, 2010; Hasler *et al.*, 1999; Zanger, 2008).

Os CYPs são membros de uma classe de enzimas designadas por oxigenases, mais especificamente, são monooxigenases ou oxidases de função mista. Participam em muitas funções essenciais para a manutenção da saúde e bem-estar de um indivíduo, desempenhando um papel chave na biologia humana e terapêuticas médicas (Hasler *et al.*, 1999).

Esta superfamília de enzimas intervém na protecção de organismos biológicos de compostos potencialmente tóxicos provenientes da sua actividade ao biotransformar substratos lipófilos de diversas estruturas em metabolitos, posteriormente excretados do corpo. Os CYPs são também essenciais para a vida eucariótica devido aos seus papéis no metabolismo dos esteróis tais como colesterol, ácidos biliares, ácidos gordos, prostaglandinas, leucotrienos, retinóides e aminas biogénicas (Chen & Raymond, 2006). Algumas reacções catalisadas pelos CYPs, nos mamíferos, são:

- a) A conversão do colesterol em androgénios, estrogénios e corticóides;
- b) A síntese e degradação das prostaglandinas e outros ácidos gordos insaturados;
- c) A conversão de vitaminas nas suas formas bioactivas;
- d) O metabolismo do colesterol em ácidos biliares;
- e) E um grande número de reacções envolvidas no metabolismo de xenobióticos.

Os P450s desempenham um papel central no metabolismo celular e na manutenção da homeostase celular. (Hasler *et al.*, 1999)

Tendo em conta o seu envolvimento na biotransformação de carcinogénios e procarcinogénios, polimorfismos genéticos desta família de enzimas estão associados com a carcinogénese de vários cancros, incluindo o carcinoma hepatocelular (Chen & Raymond, 2006).

A biotransformação de fase I é mediada principalmente por estes enzimas (Crettol, 2010).

O metabolismo das drogas através dos CYPs apresenta variabilidade genética, influenciando a resposta do paciente a uma droga particular, o que explica grande parte das diferenças interindividuais e interétnicas (Hasler *et al.*, 1999; Lynch & Price, 2007)

Todos os genes CYP das famílias 1 a 3 são altamente polimórficos, os enzimas codificados podem exibir diminuição, aumento ou ausência de actividade (Crettol, 2010).

Se o alelo mutante ocorre com uma frequência de pelo menos 1% na população normal e causa uma resposta à droga ou fenótipo diferentes, este fenómeno é denominado como polimorfismo farmacogenético (Hasler *et al.*, 1999).

Os portadores de duas cópias do alelo variante são metabolizadores lentos (PM), enquanto os portadores de um selvagem e de um alelo variante (metabolizadores intermediários) têm a actividade do enzima reduzida. O fenótipo metabolizador “ultra-rápido” ocorre quando se herdarem múltiplas cópias dos alelos selvagens, resultando num excesso de actividade enzimática. A variância na resposta a drogas entre pessoas de diferentes origens étnicas é, principalmente, causada por polimorfismos do CYP450, podendo também dever-se a variações genéticas noutros enzimas metabolizadores, transportadores e receptores de drogas (Lynch & Price, 2007).

A resposta variada é devida, em muitos casos, a diferenças na quantidade de CYP expresso no intestino e no fígado. A influência da dieta, a exposição precoce a outras drogas que podem servir como indutores, e os hábitos pessoais, tais como, fumar e consumo de álcool, são causas da mudança do nível de expressão dos CYPs. A presença de formas polimórficas com actividades modificadas tem sido identificada como a origem das diferenças da resposta à terapêutica (Hasler *et al.*, 1999).

As principais fontes de variabilidade inter-individual e intra-individual na actividade dos CYPs são influências ambientais, incluindo a inibição ou indução por medicações concomitantes (interacções medicamentosas), factores biológicos incluindo o sexo e determinantes fisiológicos, como o estado hormonal, doença e ritmos circadianos, e polimorfismos genéticos nos genes do complexo do CYP450 e os seus reguladores. Existem grandes diferenças

entre as isoformas individuais dos CYPs quanto à sua susceptibilidade a estes mecanismos (Zanger *et al.*, 2008).

Alterações dos CYPs podem também afectar o metabolismo de hormonas sexuais, que desempenham um papel importante na carcinogénese de vários cancros, como o carcinoma hepatocelular (Chen & Raymond, 2006).

1.7.1.1. CYP2C9

O CYP2C9, principal enzima da subfamília 2C, é expresso abundantemente a nível hepático (aproximadamente 20% do conteúdo microsomal total de P450 no fígado) e metaboliza cerca de 10% das drogas com importância terapêutica (Crettol *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2002; Zanger *et al.*, 2008).

O gene CYP2C9 é altamente polimórfico, localiza-se na região cromossómica 10q²⁴, abrangendo aproximadamente 55 kb com 9 exões e codifica uma proteína com 490 resíduos de aminoácidos (Babaoglu *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2002).

As variantes alélicas deste gene exibem geralmente uma actividade catalítica reduzida com valores de K_m elevados (baixa afinidade para os substratos) e/ou taxas máximas de metabolismo reduzidas ($V_{máx}$ baixa), resultando numa baixa depuração intrínseca aparente ($V_{máx}/K_m$) (Xie *et al.*, 2002).

O CYP2C9 exhibe uma grande variabilidade inter-individual na sua expressão e actividade catalítica devido a variações genéticas que podem resultar em toxicidade clinicamente relevante da droga em alguns pacientes ou eficácia inadequada da droga e falha terapêutica noutros; à interacção de factores como a inibição ou indução por drogas, assim como, à presença de numerosos polimorfismos de um único nucleótido (SNPs). (Kirchheiner *et al.*, 2004; Xie *et al.*; 2002).

As substituições de aminoácidos hereditárias, Arg¹⁴⁴ (CGC) para Cys¹⁴⁴ (TGC) (CYP2C9*2) e Ile³⁵⁹ (ATT) para Leu³⁵⁹ (CTT) (CYP2C9*3), afectam as funções catalíticas do CYP2C9, contribuindo para a variabilidade farmacocinética (Kirchheiner *et al.*, 2004; Xie *et al.*; 2002).

Os alelos CYP2C9*2 e *3 estão associados a reduções significativas mas altamente variáveis na depuração intrínseca, dependendo dos próprios

substratos. O alelo *3 é afectado mais fortemente que o *2, e a redução na actividade atinge 90% para alguns substratos (Xie *et al.*, 2002; Zanger *et al.*, 2008).

A baixa actividade dos alelos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 é relativamente comum nos Caucasianos (frequências de 11% e 7%, respectivamente), enquanto os alelos mais raros CYP2C9*5, *6, *8, *9 e *11 são mais prevalentes nas populações africanas (Crettol *et al.*, 2010).

Entre subgrupos étnicos de populações, pode haver pequenas diferenças nas frequências destes genótipos, sendo que a variante CYP2C9*2 está quase ausente nas populações africanas e asiáticas. Estão identificadas, pelo menos, 17 drogas cuja farmacocinética está comprometida em portadores destes alelos, incluindo a fluvastatina (FLV), S-varfarina, glipizida e ibuprofeno (Crettol *et al.*, 2010).

Para além dos CYP2C9*2 e *3, estão descritas mais variáveis dentro do CYP2C9, mas as suas frequências são, geralmente baixas ou os polimorfismos não são responsáveis pela troca de um aminoácido (mutações silenciosas). O CYP2C9 metaboliza todos os antagonistas da vitamina K (varfarina), vários hipoglicemiantes orais (glipizida), anticoagulantes orais (varfarina), a maioria das drogas anti-inflamatórias não esteróides (AINEs) como o ibuprofeno, vários antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARA) como o losartan, e outras drogas, como a FLV (Crettol *et al.*, 2010; Kirchheiner *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2002).

O CYP2C9 tem como substratos endobióticos esteróides (estradiol, estrona, progesterona e testosterona), hormonas sintéticas (desogestrel e tamoxifeno) e ácidos gordos (ácidos araquidónico e linolénico) (Kirchheiner *et al.*, 2004).

Na HCC, o estudo destas variantes genéticas do CYP2C9 é relevante, de modo a avaliar se a resposta a uma futura terapia coadjuvante com FLV, nestes doentes, estará relacionada com o efeito da droga que pode resultar da variação genética individual (Badder *et al.*, 2008; Crettol *et al.*, 2010).

Chen & Raymond (2006) demonstraram a existência do polimorfismo CYP2C9*2 em linhas celulares derivadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), que corresponde ao identificado em pacientes com metabolismo lento como os homocigóticos do CYP2C9*2. Assim, este polimorfismo do CYP2C9

pode também estar envolvido na carcinogénese do carcinoma hepatocelular, complicação associada à cirrose hepática (Chen & Raymond, 2006).

1.7.1.2. CYP2D6

O CYP2D6, localizado na região 22q13.1, foi o primeiro CYP para o qual um polimorfismo farmacogenético clássico se tornou conhecido. É expresso principalmente no fígado, mas também se encontra nos neurónios, onde pode participar no metabolismo local de drogas e/ou em certas biotransformações de substâncias endógenas (Sachse *et al.*, 1997; Zanger *et al.*, 2004).

O CYP2D6 tem uma grande influência genética e, como os factores ambientais têm menor importância, o fenótipo de oxidação das drogas por este CYP, normalmente determinado a partir da razão metabólica urinária de um teste, representa um parâmetro pessoal estável e reproduzível (Zanger *et al.*, 2004).

O CYP2D6 tem um papel importante no metabolismo de cerca de 25% das drogas conhecidas. Os substratos típicos incluem: neurolépticos, como a risperidona, haloperidol e tioridazina, antiarrítmicos, como o metoprolol e propafenona, a maioria dos anti-depressivos tricíclicos (ADT) e inibidores selectivos da recaptção da serotonina (ISRS), β -bloqueantes, codeína, tramadol e tamoxifeno (Crettol *et al.*, 2010).

Em contraste com outros CYPs, a expressão do CYP2D6 não é induzida por drogas nem outras substâncias químicas. No entanto, é inibido por um grande número de drogas (Crettol *et al.*, 2010; Ingelman-Sundberg, 2005).

O CYP2D6 é o CYP polimórfico mais estudado, com mais de 100 variantes alélicas descritas. O fenótipo PM (metabolizador lento) do CYP2D6 ocorre em 5-10% dos Caucásianos, mas em menos de 1% dos Asiáticos e Africanos. Isto deve-se a vários alelos nulos, os mais frequentes o CYP2D6*4, que codifica um mRNA com uma mutação no local de *splicing* e o CYP2D6*5, sendo os alelos *3 e *6 menos comuns. O alelo mais comum entre os PM é o CYP2D6*4, que representa mais de 70% dos alelos CYP2D6 em indivíduos PM e tem uma frequência alélica de aproximadamente 21% nas populações caucasianas. Os restantes alelos referidos, CYP2D6*3, CYP2D6*5 e CYP2D6*6, apresentam frequências alélicas de 2, 5 e 0,9%, respectivamente. O fenótipo de metabolizador intermediário ocorre em 10-15% dos caucásianos

e é atribuído à baixa actividade do alelo *41. Outros alelos comuns com diminuição de actividade são o CYP2D6*17 em Africanos e CYP2D6*10 em Asiáticos, com frequências de cerca de 30% e 50% nestas populações (Crettol *et al.*, 2010).

O CYP2D6 apresenta duplicação de genes (2-13 cópias), cuja frequência varia entre 10% e mais de 50% em algumas étnias, como populações Árabes, da África Oriental e Pacífico, enquanto na Europa é normalmente entre 1 e 5% (Crettol *et al.*, 2010).

A ingestão de alimentos ricos em substratos alcalóides, metabolitos do CYP2D6, por indivíduos do Norte de África Oriental e da região Mediterrânea pode ter resultado na pressão selectiva, que levou à duplicação do gene, responsável pelo fenótipo de metabolizador “ultra-rápido” (Crettol *et al.*, 2010; Zanger *et al.*, 2004).

Os enzimas CYP2D6 localizam-se no RE dos hepatócitos e têm sido associados com o metabolismo do ácido araquidónico (AA). O AA está envolvido na produção de colagénio pelas células estreladas hepáticas. Cinco a dez por cento dos Caucasianos são PM devido à baixa actividade deste enzima.

O polimorfismo CYP2D6*4 (substituição G-A na posição 1934) tem sido associado com vários processos de carcinogénese, tais como, cancro dos pulmões e da laringe e o carcinoma hepatocelular, principalmente em pacientes infectados pelo VHC. Além disso, têm sido encontradas frequências diferentes dos alelos PM em pacientes com cirrose vs pacientes sem cirrose. Por isso, surgiu a hipótese do alelo PM ter algum efeito na taxa de progressão para cirrose (Fishman *et al.*, 2006).

Fishman *et al.* (2006) constataram que o CYP2D6*4 está associado com a taxa acelerada de fibrose em pacientes com HCC. A frequência do alelo é significativamente maior nos indivíduos que progrediram mais rapidamente para estadios de fibrose superiores (F3-F4) do que nos indivíduos com índices de fibrose menores (F1-F2). O CYP2D6*4 pode, então, tornar-se um biomarcador genético não invasivo, permitindo a identificação de pacientes infectados com VHC com maior susceptibilidade de progressão para cirrose (F4) numa fase precoce da infecção. O estudo desta variante alélica poderá

não só direccionar o tratamento adequado aos pacientes atempadamente, mas também prevenir tratamentos desnecessários (Fishman *et al*, 2006).

2. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho é estudar a associação de alguns biomarcadores genéticos com marcadores clínicos (esteatose, fibrose, genótipo viral e a resposta à terapêutica) relativos à HCC.

2.1. Patogenia da HCC

Pretende-se analisar se o polimorfismo C8090T no gene da OPN está associado à HCC, podendo conferir uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento e progressão de fibrose e correlacionar-se com o tipo de resposta à terapêutica.

Através do estudo do polimorfismo CYP2D6*4, associado com a taxa de progressão de fibrose hepática, espera-se identificar a susceptibilidade para o desenvolvimento de cirrose numa fase precoce da infecção.

2.2. Terapêutica da HCC

Pretende-se prever o tipo de resposta a uma terapêutica coadjuvante com fluvastatina através do estudo de polimorfismos genéticos do CYP2C9 (CYP2C9*2 e CYP2C9*3) associados ao fenótipo de metabolizador lento.

3. Materiais e métodos

3.1. População de estudo

3.1.1. Origem das amostras

As amostras de sangue utilizadas neste estudo provêm de pacientes seguidos na consulta de Hepatologia do Serviço de Gastrenterologia do Hospital de Santa Maria (Centro Hospitalar Lisboa Norte) / Centro Académico de Medicina de Lisboa.

Neste estudo incluem-se pacientes com HCC, após consentimento informado. Como factores de exclusão destacam-se: a presença de outras doenças metabólicas (hemocromatose, diabetes *mellitus*, etc), co-infecções VHB/VIH, consumo de drogas e de álcool > 40mg/dia e recusa em participar no estudo. O grupo de controlo é constituído por pacientes seguidos no Centro de Endocrinologia e Metabolismo de Lisboa, após consentimento informado. Como factor de inclusão seleccionaram-se indivíduos com IMC <25,0.

3.1.2. Dimensão da amostra

A amostra de estudo é constituída por 270 doentes com HCC, enquanto o grupo de controlo engloba 127 indivíduos.

3.2. Preparação das amostras de sangue

O sangue total é colhido em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e armazenado a -20°C até se proceder à extracção de DNA.

3.3. Extracção de DNA genómico

O DNA genómico é isolado a partir de 200 µL de sangue total através do kit “Jetquick blood DNA spin mini kit”, conforme as recomendações do fabricante (Genomed).

3.4. Quantificação e determinação da pureza do DNA

A quantificação (ng/µL) e determinação da pureza do DNA genómico (razão entre as absorvências a 260 e 280 nm) são determinadas num espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000).

3.5. Genotipagem dos CYP2C9/2D6 e OPN por PCR-RFLP

A detecção das variantes alélicas dos CYP2C9, CYP2D6 e OPN C8090T é realizada pelo método de reacção em cadeia da polimerase - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP), num termociclador GeneAmp® PCR System 2700. A mutação do CYP2D6*6 necessita das mesmas condições de PCR-RFLP que o polimorfismo CYP2D6*4, por esse facto procedeu-se à sua genotipagem em paralelo (Gu *et al.*, 2010; Niino *et al.*, 2003; Sachse *et al.*, 1997).

3.5.1. Condições de PCR-RFLP - CYP2C9/2D6

Para a genotipagem dos CYP2C9/2D6, as sequências de interesse das amostras de DNA são amplificadas por PCR num volume final de 25 µL, contendo 150 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada *primer* (*foward* e *reverse*), 12,5 µL de 2x *DyNAzyme II PCR Master Mix* (0,04 U/µl *DyNAzyme II DNA Polymerase*, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 3 mM MgCl₂, 100mM KCl e 400 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP) e um volume variável de água bidestilada e desionizada (Tabela 1) (Gu *et al.*, 2010; Sachse *et al.*, 1997).

Tabela 1 - *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse dos CYP2C9, CYP2D6 e OPN (adaptado de Gu *et al.*, 2010; Niino *et al.*, 2003; Sachse *et al.*, 1997).

Variante alélica	Sequência do <i>primer</i>	Fragmento de amplificação
CYP2C9*2	F: 5'-TACAAATACAATGAAAATATCATG-3'	690 pb
	R: 5'-CTAACAACCAGGACTCATAAT-3'	
CYP2C9*3	F: 5'-TGGTGCACGAGGTCCAGATG-3'	159 pb
	R: 5'-GATACTATGAATTTGGGGACTTCGA-3'	
CYP2D6*4/*6	F: 5'-CCTGGGCAAGAAGTCGTCCGACCAG-3'	353 pb
	R: 5'-GAGACTCCTCGGTCTCTCG-3'	
OPN	F: 5'-CCCGGCCATCTTAATTTTCAGACCCTTC-3	110 pb
	R: 5'-GAGTCCTGGCTGTCCACATGGTG-3'	

F- *forward*, R- *reverse*

As condições de amplificação consistem numa desnaturação inicial (94°C, 2 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação, emparelhamento e extensão; e uma extensão final (72°C, 7 min) (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições de amplificação utilizadas no método de PCR para cada polimorfismo/mutação (adaptado de Gu *et al.*, 2010; Niino *et al.*, 2003; Sachse *et al.*, 1997).

	CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2D6*4/*6	OPN
Desnaturação	94°, 30s	94°, 30s	94°, 30s	94°, 30s
Emparelhamento	50°C, 30 s	60°C, 30 s	57°C, 30 s	61°C, 30 s
Extensão	72°C, 45 s	72°C, 45 s	72°C, 45 s	72°C, 30 s

Temperatura (°C), tempo (s)

A confirmação da pureza e mobilidade dos produtos de PCR é realizada por electroforese (tina de electroforese BIO-RAD Sub-Cell GT, fonte Biorad PowerPac 300) em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 2%, em tampão TAE (20 Mm Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) com 1µg/mL de brometo de etídio a 0,5 mg/mL.

Posteriormente, 10 µL de produto de PCR são digeridos com 10U de enzima de restrição, 18 µL de água livre de nuclease e 2µL de 10X buffer R, *overnight* a 37°C. Após inactivação enzimática a 65°C durante 20 min, os produtos de digestão são armazenados a 4°C até serem sujeitos a electroforese.

A identificação dos produtos amplificados e digeridos é realizada numa câmara escura através de um transiluminador ultravioleta (UV) (GenoSmart, VWR) após electroforese em gel de agarose a 3% (Tabela 3).

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizados na digestão dos fragmentos de interesse e genótipos possíveis (adaptado de Gu *et al.*, 2010; Niino *et al.*, 2003; Sachse *et al.*, 1997).

Variante alélica	Enzima de restrição	Fragmentos de digestão	Genótipos
CYP2C9*2	Eco47I	169 pb, 522 pb, 690 pb	CC (521pb + 169pb) CT (690pb + 521pb + 169pb) TT (690pb)
CYP2C9*3	Mph1103I	25 pb, 134 pb, 159 pb	AA (134pb + 25pb) AC (159pb + 134pb + 259pb) CC (159pb)
CYP2D6*4	Mval	163 pb, 190 pb, 353 pb	GG (190pb + 163pb) GA (353pb + 190pb + 163pb) AA (353pb)
CYP2D6*6		25 pb, 328 pb, 353 pb	Del/Del (25pb + 328pb) T/Del (353pb + 328pb +25pb) TT (353pb)
OPN	Mbol	26 pb, 84 pb, 110 pb	TT (84 pb) CC (110 pb) CT (26 pb + 84 pb + 110 pb)

3.5.2. Condições de PCR-RFLP- OPN

Relativamente à genotipagem do gene OPN, a sequência de interesse é amplificada por PCR, utilizando-se uma mistura reaccional com um volume final de 50 µL, contendo 150 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada *primer* (*foward* e *reverse*), 25 µL de 2x DyNAzyme II PCR Master Mix, 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) a 5% e um volume variável de água bidestilada e desionizada (Tabelas 1 e 2) (Niino *et al.*, 2003).

Os produtos amplificados (20 µL) são digeridos com 10 U de enzima de restrição, 7 µL de água livre de nuclease e 2µL de 10X buffer R.. Os restantes passos não referidos para a OPN são concordantes com os mencionados para os CYP2C9/2D6 (Tabela 3).

3.6. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram tratados e analisados nos programas SPSS versão 16.0 e *Primer of Biostatistics* versão 5.0, sendo o nível de significância estabelecido para $p < 0,05$.

Para verificar se uma população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson.

O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da distribuição das variáveis. Para averiguar a existência de diferenças significativas entre variáveis contínuas normais entre os três grupos de respondedores à terapêutica, recorreu-se ao teste paramétrico de análise de variância (ANOVA); e ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as variáveis contínuas não normais.

Para testar a semelhança entre variáveis categóricas discretas, por exemplo, o número de indivíduos com determinado polimorfismo na população de estudo e na população controlo, utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson.

Com o objectivo de calcular o risco dos portadores de um determinado genótipo, calculou-se o *odds ratio* (OR). O OR define-se como a razão de probabilidades de ocorrência de determinado genótipo/alelo nos casos e nos controlos, permitindo obter uma estimativa do risco relativo.

O programa Epi Info versão 6 foi utilizado para a análise da tendência linear dos riscos, com o objectivo de determinar o risco relativo entre a associação do número de cópias de um alelo e o risco/susceptibilidade para a hepatite C crónica.

O teste t de Student é utilizado para comparar as médias entre parâmetros bioquímicos avaliados antes e após a terapêutica nos indivíduos com resposta sustentada.

4. Resultados

Os resultados apresentados correspondem ao estudo realizado no grupo de pacientes com HCC, seguidos na consulta de Hepatologia do Serviço de Gastrenterologia do Hospital de Santa Maria; e ao grupo de pacientes seguidos no Centro de Endocrinologia e Metabolismo de Lisboa, utilizados como grupo de controlo.

Inicialmente, os indivíduos foram seleccionados de acordo com os critérios mencionados, contudo nem todos foram incluídos na análise de resultados devido a problemas técnicos na obtenção de resultados ou por falta de material biológico.

4.1. Características dos pacientes

4.1.1. Características demográficas e bioquímicas

As características demográficas e bioquímicas dos 263 pacientes com HC e dos 127 controlos, disponíveis e relevantes para este estudo, estão referidas na Tabela 4. Entre os dois grupos de estudo existem diferenças significativas em relação ao sexo, idade, IMC, *homeostatic model assessment* (HOMA), colesterol total, colesterol das HDL e triglicéridos ($p < 0,05$). Por outro lado, não se observaram diferenças significativas relativamente à glicémia e colesterol das LDL ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Características demográficas e bioquímicas dos grupos de estudo e controlo.

Variáveis		Pacientes (n=263)	Controlos (n=127)	p (qui-quadrado)
Sexo	Feminino	96 (35,60%)	108 (85,00%)	0,000
	Masculino	174 (64,40%)	19 (15,00%)	
Idade		44,98±11,39	47,23±14,94	0,006
IMC (kg/m ²)		25,31±3,78	22,43±2,14	0,000
Glicémia (mg/dl)		86,0 (61,00-288,00)	79,02 (59,94-279,72)	0,165
Insulina (mcU/ml)		11.21 ± 7,98	N/A	N/A
HOMA (mcU/ml.mg.dl)		2.61 ± 2,07	1,12±0,63	0,000
Colesterol total (mmol/l)		4.44 ± 1,00	4,96±0,90	0,000
Colesterol das LDL (mmol/l)		2.52 ± 0,96	1,69±0,40	0,053
Colesterol das HDL (mmol/l)		1.30 ± 0,54	2,83±0,81	0,000
Triglicéridos (mmol/l)		1,13 (0,33-13,57)	0,97±0,45	0,000
GGT (IU/l)		46 (8-1139)	N/A	N/A
FA (µg/dl)		67 (27-395)	N/A	N/A
ALT (IU/l)		73 (15-505)	N/A	N/A
AST (IU/l)		45 (16-654)	N/A	N/A

N/A - não aplicável

4.1.2. Características fisiopatológicas e resposta à terapêutica

Neste grupo de estudo, destacam-se diferentes modos de transmissão da infecção: parentérico (57,0%), espontâneo (26,7), sexual (3,0%), vertical (1,5%), e é desconhecido em 11,5% dos indivíduos (N=270).

A esteatose hepática, ou fígado gordo, é classificada como moderada (graus 1-2) e grave (graus 3-4). A esteatose foi diagnosticada em 73,7% dos indivíduos, dos quais 51,4% apresentavam graus de esteatose mais baixos (1-2) e 21,7% graus mais elevados 3-4 (N=270).

A progressão da fibrose é avaliada do estadio 0 (sem fibrose) ao estadio 4 (cirrose). A distribuição dos indivíduos por estadio de fibrose é o seguinte: grau 1- 29,2%; grau 2- 45,4%; grau 3- 11,1% e grau 4- 14,4%. Verifica-se que a maioria dos indivíduos apresenta estadios de fibrose mais baixos antes da terapêutica (N=216).

Nestes indivíduos, a distribuição dos genótipos 1, 2, 3 e 4 do VHC é 63,4%, 2,6%, 24,7% e 8,5%, respectivamente; e 0,9% dos indivíduos estão infectados com os genótipos 1+3 (N=235).

Os doentes foram previamente submetidos a terapêutica com IFN- α (2a ou 2b) peguilado e RBV de acordo com as Linhas de Orientação.

Como não respondedores (NR) definem-se aqueles com virémia detectável no final do tratamento. Os respondedores podem sofrer recidiva (RR), se a virémia for indetectável no final do tratamento mas detectável após 6 meses; ou apresentar uma resposta viral sustentada (RS), sendo a virémia indetectável no final do tratamento e nos 6 meses seguintes.

No tratamento e análise dos dados compararam-se os três tipos de respondedores separadamente (NR, RR e RS) (Tabela 5). As características clínicas e bioquímicas são semelhantes entre os três grupos. Nesta amostra não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas variáveis IMC, fosfatase ácida (FA), ALT, AST, colesterol total, colesterol das LDL, colesterol das HDL, triglicéridos, glicémia, insulina e HOMA. Relativamente à idade e à GGT, verificaram-se diferenças estaticamente significativas entre os 3 grupos de respondedores, registando-se os valores mais elevados no grupo dos NR.

Tabela 5 - Características demográficas e bioquímicas consoante a resposta à terapêutica.

Variáveis	Tipo de resposta						p
	N	RS	N	RR	N	NR	
Idade (anos)	86	40,49±8,67	22	45,77±10,63	55	46,49±12,22	0,002
IMC (kg/m ²)	86	25,26±3,10	22	24,04±3,62	52	25,89±4,35	0,134
GGT (IU/l)	87	40 (8-326)	22	35 (14-124)	46	63 (17-361)	0,000
FA (µg/dl)	69	64 (27-188)	20	62 (39-95)	40	67 (34-395)	0,338
ALT (IU/l)	87	80 (19-471)	22	74 (35-393)	47	80 (29-505)	0,607
AST (IU/l)	85	49 (16-235)	22	44 (24-194)	47	48 (24-243)	0,527
Colesterol total (mmol/l)	77	4,34±1,08	21	4,08±0,92	40	4,45±0,83	0,401
Colesterol das LDL (mmol/l)	33	2,29±0,97	13	2,55±0,81	20	2,73±0,85	0,242
Colesterol das HDL (mmol/l)	41	1,26±0,51	13	0,96±0,54	23	1,31±0,63	0,162
Triglicéridos (mmol/l)	76	1,16 (0,46-9,61)	21	0,94 (0,54-3,44)	40	1,20 (0,53-5,36)	0,222
Glicémia (mg/dl)	29	83,00 (61-126)	8	86,00 (69-92)	23	85,00 (66-277)	0,874
Insulina (mcU/ml)	23	9,58±6,22	7	9,53±4,19	20	11,29±7,17	0,784
HOMA (mcU/ml.mg.dl)	23	2,12±1,59	7	2,00±0,97	19	2,50±1,76	0,654

Valores correspondentes à média ± desvio padrão ou à mediana (mínimo - máximo)

Analisando os dados referentes aos graus de esteatose e estadios de fibrose não existem diferenças significativas entre os 3 grupos de respondedores à terapêutica (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Grau de esteatose consoante a resposta à terapêutica.

			Tipo de resposta			Total
			RS	RR	NR	
Grau de esteatose	0	n (esteatose)	12 (41,4%)	7 (24,1%)	10 (34,5%)	29 (100,0%)
		Com resposta	26,1%	50,0%	25,6%	29,3%
		Total (esteatose)	12,1%	7,1%	10,1%	29,3%
	1	n (esteatose)	12 (46,2%)	5 (19,2%)	9 (34,6%)	26 (100,0%)
		Com resposta	26,1%	35,7%	23,1%	26,3%
		Total (esteatose)	12,1%	5,1%	9,1%	26,3%
	2	n (esteatose)	8 (38,1%)	2 (9,5%)	11 (52,4%)	21 (100,0%)
		Com resposta	17,4%	14,3%	28,2%	21,2%
		Total (esteatose)	8,1%	2,0%	11,1%	21,2%
	3	n (esteatose)	12 (60,0%)	0 (0,0%)	8 (40,0%)	20 (100,0%)
		Com resposta	26,1%	0,0%	20,5%	20,2%
		Total (esteatose)	12,1%	0,0%	8,1%	20,2%
	4	n (esteatose)	2 (66,7%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	3 (100,0%)
		Com resposta	4,3%	0,0%	2,6%	3,0%
		Total (esteatose)	2,0%	0,0%	1,0%	3,0%
Total	N (esteatose)	46 (46,5%)	14 (14,1%)	39 (39,4%)	99 (100,0%)	
	Com resposta	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Qui-quadrado de Pearson, $p = 0,352$

Tabela 7- Estadio de fibrose consoante a resposta à terapêutica.

			Tipo de resposta			Total
			RS	RR	NR	
Estadio de fibrose	1	n (fibrose)	22 (48,9%)	5 (11,1%)	18 (40,0%)	45 (100,0%)
		Com resposta	28,9%	25,0%	36,0%	30,8%
		Total (fibrose)	15,1%	3,4%	12,3%	30,8%
	2	n (fibrose)	37 (56,9%)	12 (18,5%)	16 (24,6%)	65 (100,0%)
		Com resposta	48,7%	60,0%	32,0%	44,5%
		Total (fibrose)	25,3%	8,2%	11,0%	44,5%
	3	n (fibrose)	8 (50,0%)	2 (12,5%)	6 (37,5%)	16 (100,0%)
		Com resposta	10,5%	10,0%	12,0%	11,0%
		Total (fibrose)	5,5%	1,4%	4,1%	11,0%
	4	n (fibrose)	9 (45,0%)	1 (5,0%)	10 (50,0%)	20 (100,0%)
		Com resposta	11,8%	5,0%	20,0%	13,7%
		Total (fibrose)	6,2%	0,7%	6,8%	13,7%
	Total	N (fibrose)	76 (52,1%)	20 (13,7%)	50 (34,2%)	146 (100,0%)
		Com resposta	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Qui-quadrado de Pearson, $p=0,350$

Os genótipos do VHC foram agrupados consoante a sua sensibilidade ou resistência à terapêutica, sendo os genótipos 1 e 4 associados a uma maior resistência e os genótipos 2 e 3 a uma maior sensibilidade. Verificou-se a existência de diferenças significativas entre o tipo de genótipo do VHC e o tipo de resposta à terapêutica, RS *versus* RR+NR ($p=0,000$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Genótipos do VHC dos diferentes tipos de respondedores; genótipos do VHC 3+2 (mais sensíveis à terapêutica) *versus* 1+4 (mais resistentes à terapêutica).

Genótipo do VHC		Tipo de resposta		
		RS	RR+NR	Total
1+4	n (genótipo 1+4)	44 (40,4%)	65 (59,6%)	109 (100,0%)
	Com resposta	53,7%	90,3%	70,8%
	Total (genótipo 1+4)	28,6%	42,2%	70,8%
2+3	n (genótipo 2+3)	38 (84,4%)	7 (15,6%)	45 (100,0%)
	Com resposta	46,3%	9,7%	29,2%
	Total (genótipo 2+3)	24,7%	4,5%	29,2%
Total	N (genótipos 1+4 e 2+3)	82 (53,2%)	72 (46,8%)	154 (100,0%)
	Com resposta (%)	100,0%	100,0%	100,0%

Qui-quadrado de Pearson, $p=0,000$

No grupo dos RR+NR, 90,3% dos indivíduos são portadores dos genótipos 1+4, o que coincide com dados teóricos que relacionam estes genótipos com uma maior resistência à terapêutica. Através da determinação do OR, verificou-se que os indivíduos portadores dos genótipos 1+4 têm um risco acrescido de não responderem ao tratamento em comparação com os portadores dos genótipos 2 e 3. O que é concordante com dados teóricos já referidos.

Apesar de não existirem diferenças significativas entre indivíduos portadores de diferentes genótipos do VHC e o grau de esteatose, neste estudo verificou-se uma tendência para os portadores do genótipo 3 apresentarem níveis de esteatose mais altos antes da terapêutica (resultados não mencionados). Este facto coincide com evidências virológicas e clínicas, mencionadas no estado da arte, que referem que a esteatose hepática é a expressão morfológica do efeito citopático viral em pacientes infectados com o genótipo 3 do VHC (Rubbia-Brandt *et al.*, 2000).

No grupo de indivíduos com RS à terapêutica avaliaram-se os parâmetros bioquímicos mais relevantes para o estudo, com o intuito de averiguar se existiam diferenças significativas antes e após a terapêutica. O grupo de pacientes com HCC apresenta diferenças significativas, nos

parâmetros AST, ALT, GGT, triglicéridos e colesterol total, avaliados antes e após a terapêutica. Os valores das transaminases AST e ALT e da GGT são mais elevados antes da terapêutica. Estes níveis elevados das transaminases são indicadores de necrose hepatocelular e, juntamente com a γ -glutamilttransferase (GGT), têm sido utilizados como marcadores de lesão hepática (Coban *et al.*, 2011; Haren *et al.*, 2010; Sanai *et al.*, 2008). Pelo contrário, os triglicéridos e o colesterol total têm valores acrescidos após a terapêutica. Os valores do colesterol das HDL e LDL, glicémia, insulina e HOMA, apesar de não apresentarem diferenças significativas antes e após a terapêutica, são também mais elevados após a terapêutica. Estes pacientes têm características bioquímicas que evidenciam a presença de síndrome metabólica (Tabela 9).

O grau de esteatose e estadio de fibrose também foram avaliados antes e após a terapêutica. Observaram-se diferenças significativas entre o estadio de fibrose ($p=0,010$), mas o mesmo não se verificou em relação à presença de esteatose ($p=0,809$). Nos indivíduos RR e NR não se verificaram diferenças significativas relativamente à fibrose ($p=0,288$) e esteatose ($p=0,949$).

Tabela 9 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos, antes e após a terapêutica, dos pacientes com resposta sustentada.

Variáveis	N	Média ± desvio padrão	p (Teste T de Student)
AST ¹ (IU/l)	84	64,96 ± 47,16	0,000
AST ² (IU/l)	84	21,33 ± 5,59	
ALT ¹ (IU/l)	85	120,98 ± 96,79	0,000
ALT ² (IU/l)	85	22,82 ± 9,66	
GGT ¹ (IU/l)	86	58,26 ± 53,90	0,000
GGT ² (IU/l)	86	27,19 ± 18,98	
HDL ¹ (mmol/l)	30	1,20 ± 0,46	0,255
HDL ² (mmol/l)	30	1,29 ± 0,39	
LDL ¹ (mmol/l)	19	2,22 ± 0,97	0,232
LDL ² (mmol/l)	19	2,53 ± 0,99	
Triglicéridos ¹ (mmol/l)	63	1,61 ± 1,39	0,004
Triglicéridos ² (mmol/l)	63	2,04 ± 1,41	
Colesterol ¹ (mmol/l)	65	4,25 ± 1,07	0,002
Colesterol ² (mmol/l)	65	4,69 ± 1,23	
Glicémia ¹ (mg/dl)	21	83,57 ± 11,89	0,157
Glicémia ² (mg/dl)	21	87,14 ± 12,13	
Insulina ¹ (mcU/ml)	16	8,33 ± 3,80	0,423
Insulina ² (mcU/ml)	16	9,59 ± 8,21	
HOMA ¹ (mcU/ml.mg.dl)	14	1,71 ± 0,90	0,366
HOMA ² (mcU/ml.mg.dl)	14	2,13 ± 2,17	

¹ - antes da terapêutica; ² - após a terapêutica

4.2. Genotipagem dos polimorfismos por PCR-RFLP

4.2.1. Identificação dos polimorfismos/mutação

A identificação dos produtos amplificados e digeridos é realizada numa câmara escura através de um transiluminador UV após electroforese em gel de agarose a 3%. Para a identificação do peso molecular das bandas são utilizados os marcadores A e B (Figura 6).

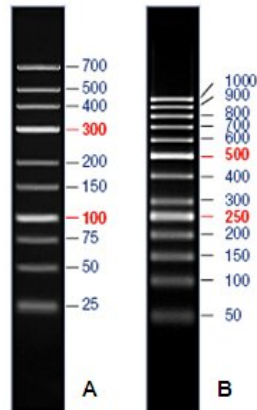


Figura 6 - Marcadores de peso molecular.

A- *GeneRuler™ Low Range DNA Ladder*, 25-700 pb; B - *GeneRuler™ 50 pb DNA Ladder*, 50-1000 pb (<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis>).

4.2.1.1. Identificação do polimorfismo C8090T do gene da OPN

Na Figura 7 estão representados os diferentes genótipos resultantes da genotipagem do *locus* 8090 do gene da OPN. A banda de 110 pb corresponde ao produto de PCR não digerido do alelo C, enquanto as bandas de 84 pb e 26 pb (não visível) correspondem à digestão do alelo C com *Mbol*.

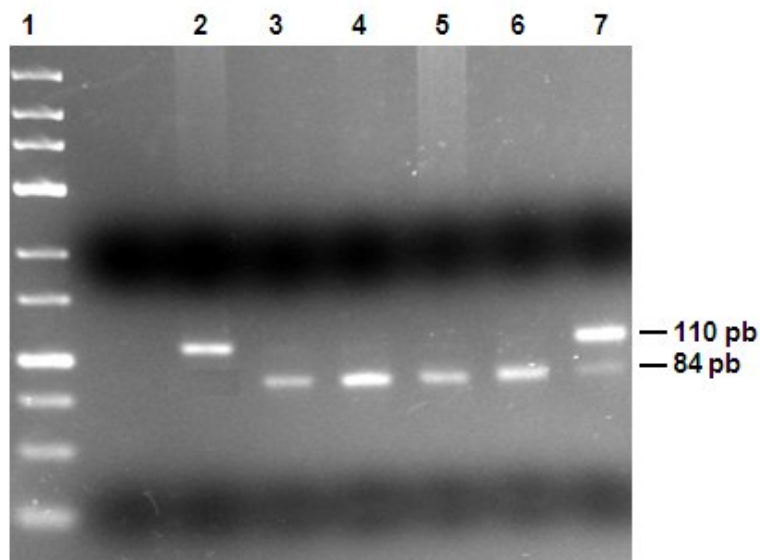


Figura 7 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do OPN C8090T. Linha 1 - Marcador A, linha 2 - homozigótico CC; linhas 3,4,5,6 - homozigóticos TT; linha 7 - heterozigótico CT.

4.2.1.2. Identificação do polimorfismo CYP2C9*2

Na Figura 8 estão representados os diferentes genótipos resultantes da genotipagem do CYP2C9*2. A banda de 690 pb corresponde ao produto de PCR não digerido do alelo T, enquanto as bandas de 521 pb e 169 pb correspondem à digestão do alelo T com Eco471.

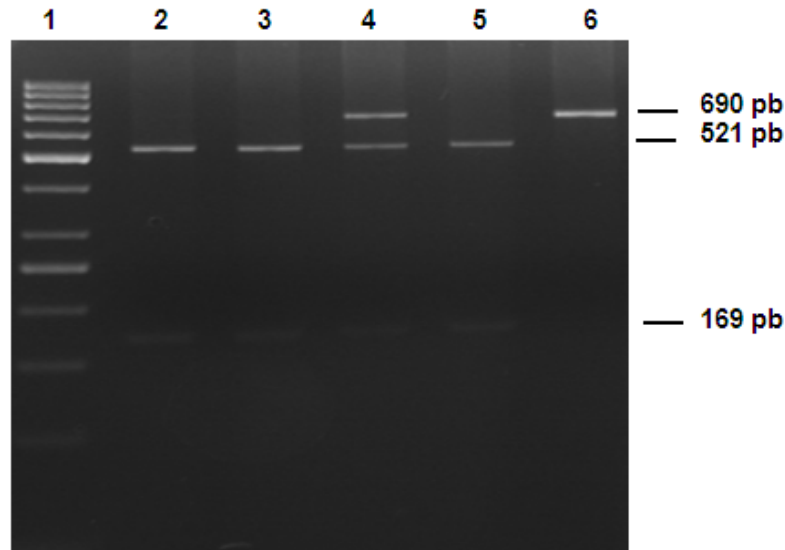


Figura 8 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do CYP2C9*2. Linha 1 - Marcador B, linhas 2, 3 e 5 - homocigóticos CC; linha 4 - heterocigótico CT; linha 6 - homocigótico TT.

4.2.1.3. Identificação do polimorfismo CYP2C9*3

Na Figura 9 estão representados os diferentes genótipos resultantes da genotipagem do CYP2C9*3. A banda de 159 pb corresponde ao produto de PCR não digerido do alelo C, enquanto as bandas de 134 pb e 25 pb correspondem à digestão do alelo C com Mph1103I.

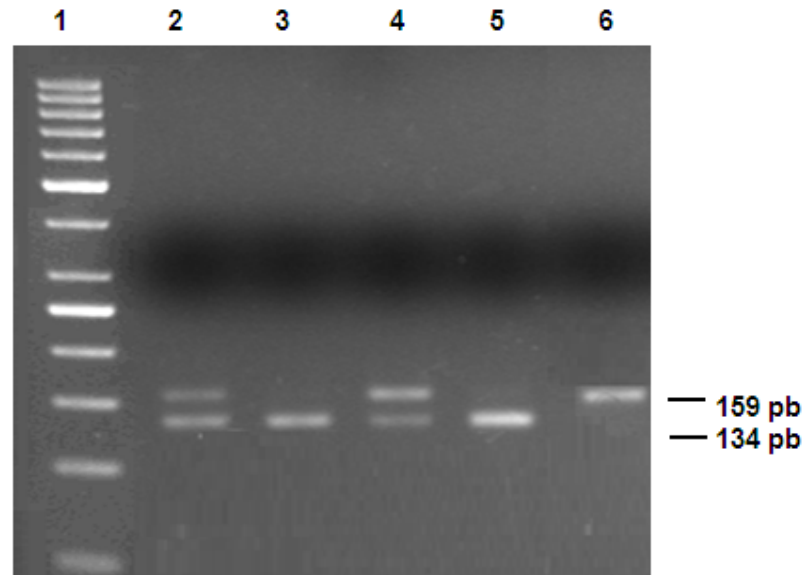


Figura 9 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do CYP2C9*3. Linha 1 - Marcador B, linhas 2 e 4 - heterozigóticos AC; linha 3 e 5 - homozigótico AA; linha 6 - homozigótico CC.

4.2.1.4. Identificação do polimorfismo/mutação CYP2D6*4/*6

Na Figura 10 estão representados os genótipos resultantes da genotipagem do CYP2D6*4/*6. A banda de 353 pb corresponde ao produto de PCR não digerido dos alelos A (CYP2D6*4) e T (CYP2D6*6), os outros fragmentos resultam da digestão com MvaI.

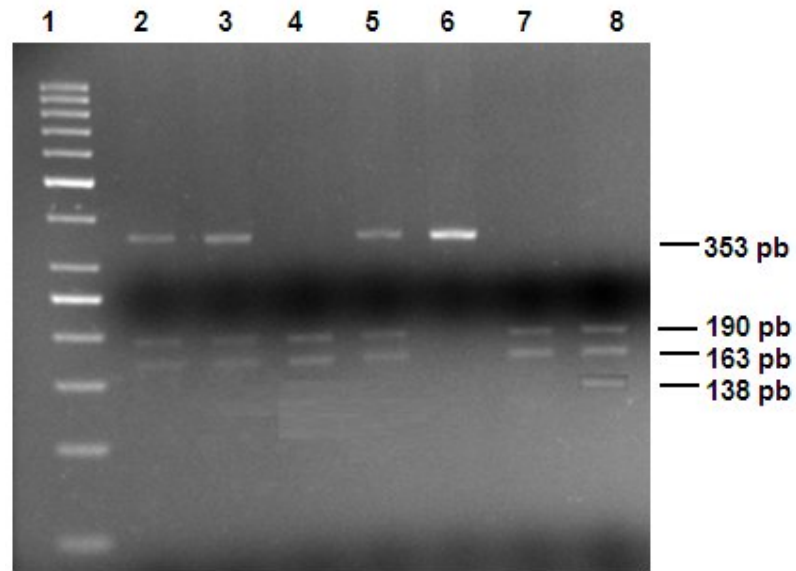


Figura 10 - Electroforese em gel de agarose a 3% de fragmentos de PCR-RFLP do CYP2D6*4/*6. Linha 1 - Marcador B, linhas 2, 3 e 5 - heterozigóticos GA (CYP2D6*4) e homozigóticos TT (CYP2D6*6); linha 4 e 7 - homozigóticos GG (CYP2D6*4) e TT (CYP2D6*6); linha 6 - homozigóticos AA (CYP2D6*4) e TT (CYP2D6*6), linha 8 - homozigótico GG e heterozigótico T Delecção (CYP2D6*6).

4.2.2. Estudo caso/controlo dos polimorfismos/mutação

Através de um estudo de associação caso/controlo, averiguou-se a possível existência ou não de associação relativa, para cada polimorfismo, entre o grupo de pacientes com HCC e o grupo de controlo. A população controlo está em equilíbrio de Hardy-Weinberg no que respeita à distribuição na população portuguesa.

Tabela 10 – Estudo caso/controlo dos polimorfismos/mutação estudados.

Polimorfismo/mutação	Genótipo	Pacientes	Controlos	p
		n (%)	n (%)	
OPN C8090T	CC	35 (23,3)	10 (10,3)	0,018
	CT	65 (43,3)	56(57,7)	
	TT	50 (33,3)	31(32,0)	
		N=150	N=97	
CYP2C9*2	CC	150 (73,9)	78 (66,1)	0,326
	CT	47 (23,2)	36 (30,5)	
	TT	6 (3,0)	4 (3,4)	
		N=203	N=118	
CYP2C9*3	AA	108 (61,7)	60 (55,0)	0,402
	AC	62 (35,4)	47 (43,1)	
	CC	5 (2,9)	2 (1,8)	
		N=175	N=109	
CYP2D6*4	AA	4 (2,4)	2 (2,0)	0,169
	GA	32 (18,8)	29 (28,7)	
	GG	134 (78,8)	70 (69,3)	
		N=170	N=101	
CYP2D6*6	DelDel	0 (0)	0 (0)	N/A
	TDel	0 (0)	1 (1)	
	TT	170 (100)	100 (99)	
		N=170	N=101	

Del - deleção; N/A - não aplicável

Em relação ao polimorfismo OPN C8090T, existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo e controlo ($p=0,018$) (Tabela 10). O genótipo CT é o mais frequente nos dois grupos e aquele que apresenta um menor risco relativo associado à HC.

Por outro lado, o genótipo CC é o que está associado a um maior risco relativo comparativamente com os outros genótipos ($p=0,008$, $OR=3,02$, 95% $IC=1,371-6,634$). Existe uma relação linear estatisticamente significativa entre os genótipos da OPN e a susceptibilidade associada à HCC ($p=0,006$) (Tabela 11).

Tabela 11- Risco relativo para associação entre os genótipos da OPN e a susceptibilidade associada à HCC.

	Pacientes	Controlos	OR	95% IC	p
Genótipos	n (%)	n (%)			
CT	65 (43,3)	56 (57,7)	1,00		
TT	50 (33,3)	31 (32,0)	1,39	0,783-2,465	0,326
CC	35 (23,3)	10 (10,3)	3,02	1,371-6,634	0,008
	N=150	N=97			

Qui-quadrado para tendência linear=7,641, p=0,006

Para além do estudo caso/controlo para cada polimorfismo, estudou-se a possível relação entre estes e o tipo de resposta à terapêutica, a existência de esteatose, os graus de esteatose e estadios de fibrose. Não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes genótipos (CC, CT, TT) e o tipo de resposta à terapêutica quer analisando-se os três tipos separadamente (p=0,455), quer agrupando os pacientes RR e NR *versus* os RS (p=0,688). O mesmo se verificou em relação ao estadio de fibrose, presença e grau de esteatose (p=0,468; p=0,102; p=0,530, respectivamente).

Para os restantes polimorfismos estudados, CYP2C9*2, CYP2C9*3 e CYP2D6*4 não se observaram diferenças significativas entre os grupos de pacientes com HC e de controlo (p=0,326; p=0,402; p=0,169, respectivamente) (Tabela 10).

No estudo dos polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3, quando analisados isoladamente, também não se observaram diferenças significativas entre os diferentes genótipos (CC, TT, CT; AA, CC, AC; respectivamente) e o tipo de resposta à terapêutica quer analisando-se os três tipos separadamente (CYP2C9*2, p=0,775; CYP2C9*3, p=0,641), quer agrupando os pacientes RR e NR *versus* os RS (CYP2C9*2, p=0,754; CYP2C9*3, p=0,356) (Tabela 10). O mesmo se verificou em relação ao estadio de fibrose (CYP2C9*2, p=0,669; CYP2C9*3, p=0,276) presença de esteatose (CYP2C9*2, p=0,448); e grau de esteatose (CYP2C9*2, p=0,448; CYP2C9*3, p=0,436).

Ao agrupar-se os indivíduos heterozigóticos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 (haplótipo CTAC), verificou-se a existência de diferenças significativas entre estes indivíduos *versus* os indivíduos não

heterozigóticos para ambos os polimorfismos, relativamente à existência e grau de esteatose e estadio de fibrose ($p=0,001$; $p=0,005$; $p=0,033$; respectivamente) (Tabelas 12, 13 e 14).

Tabela 12 - Grau de esteatose em indivíduos heterozigóticos e em portadores de outros genótipos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

Genótipos CYP2C9*2/*3	Grau de esteatose					Total
	0	1	2	3	4	
CT/AC	5	1	0	0	0	6
Outros	13	24	25	13	3	78
Total	18	25	25	13	3	84

Qui-quadrado de Pearson, $p=0,005$

Tabela 13 - Existência ou não de esteatose em indivíduos heterozigóticos e em portadores de outros genótipos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

Genótipos CYP2C9*2/*3	Sem esteatose	Com esteatose	Total
CT/AC	5	2	7
Outros	14	70	84
Total	19	72	91

Qui-quadrado de Pearson, $p=0,001$

Tabela 14 - Estadio de fibrose em indivíduos heterozigóticos e em portadores de outros genótipos para os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3.

Genótipos CYP2C9*2/*3	Estadio de fibrose				Total
	1	2	3	4	
CT/AC	1	8	0	0	9
Outros	38	50	15	25	128
Total	39	58	15	25	137

Qui-quadrado de Pearson, $p=0,033$

O haplótipo estudado parece ser protector em relação à existência de esteatose, e à progressão para graus e estadio mais avançados de esteatose e fibrose.

No estudo do polimorfismo CYP2D6*4 também não se observaram diferenças significativas entre os diferentes genótipos (AA, GG, GA) e o tipo de resposta à terapêutica quer analisando-se os três tipos separadamente ($p=0,954$), quer agrupando os pacientes RR e NR *versus* os RS ($p=0,842$). O mesmo se verificou em relação ao estadio de fibrose ($p=0,174$) presença de esteatose ($p=0,593$); e grau de esteatose ($p=0,723$).

5. Discussão

A infecção pelo VHC afecta aproximadamente 3% da população mundial. O VHC desencadeia infecções agudas e crónicas que podem levar a fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, o que constitui um problema de saúde e socioeconómico global (Pezacki *et al.*, 2010; Tang & Gris , 2009).

A terapêutica padrão, baseada na combina o do interferão-  peguillado com ribavirina, durante 24 a 48 semanas, apresenta uma taxa de resposta virológica sustentada de 44-54%, variando amplamente consoante o genótipo, etnia e histologia subjacente. Apesar de uma melhoria na eficácia da terapêutica antiviral, nos últimos anos, na prática a taxa de resposta ao tratamento é de 20% para o genótipo 1 e de 43-52% para os genótipos 2 e 3 (Burlone & Budkowska, 2009; Forde *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011; Negro, 2010; Walsh *et al.*, 2006; Wohnsland *et al.*, 2007).

Neste estudo, a taxa de resposta sustentada (RS) ao tratamento foi de 48,2% para o genótipo 1, e de 46,3% para os genótipos 2-3. A taxa de RS para portadores do genótipo 1 é bastante superior   referida no estado da arte (20%), enquanto a referente aos genótipos 2-3 é concordante (44-54%).

5.1. Patogenia da HCC

Histologicamente, diversos acontecimentos patológicos caracterizam a HCC, tais como, danos em ductos biliares, forma o de folículos linfóides e esteatose. A esteatose é um factor crucial e determinante na progressão da fibrose hepática, sendo também, e juntamente com o perfil lipídico, associada com a RS   terapêutica padrão (Miyoshi *et al.*, 2011).

A esteatose metabólica, consequência da disfun o mitocondrial envolvida no processo de β -oxida o dos ácidos gordos, está relacionada com factores de risco como a obesidade, a dislipidémia, a diabetes *mellitus* e a síndrome metabólica. A combina o deste tipo de esteatose com a presença do vírus está associada a uma progressão acelerada para fibrose (Fierbinteanu-Braticevici *et al.*, 2009). A resistência   insulina (RI) resulta em altera es no metabolismo dos lípidos (lipólise periférica, aumento da síntese de triglicéridos, aumento da absor o hepática de ácidos gordos), podendo

contribuir para a acumulação de triglicéridos hepatocelulares (Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009; Sanyal *et al.*, 2001). A excessiva acumulação de lípidos no fígado está sujeita ao ataque pelas EROs, levando à peroxidação lipídica (Ciriolo *et al.*, 1997; Fierbinteau-Braticevici *et al.*, 2009).

A associação entre a RI e a esteatose é bastante relevante dado o risco acumulado para fibrose e a redução na resposta virológica à terapêutica antiviral (Letteron *et al.*, 1996).

Os enzimas CYP2D6 localizam-se no RE dos hepatócitos e têm sido associados com o metabolismo do AA. O AA está envolvido na produção de colagénio pelas células estreladas hepáticas. Fishman *et al.* (2006) associaram o CYP2D6*4 com a taxa acelerada de fibrose em pacientes com HCC, verificando que a frequência deste alelo, na população caucasiana estudada, era significativamente maior nos indivíduos que progrediam mais rapidamente para estadios de fibrose superiores (F3-F4) do que nos indivíduos com índices de fibrose menores (F1-F2). Com base neste estudo, o CYP2D6*4 poderia tornar-se um marcador genético não invasivo, permitindo a identificação de pacientes infectados com VHC com maior susceptibilidade para a progressão para cirrose (F4) numa fase precoce da infecção. Este polimorfismo tem sido associado com vários processos carcinogénicos, tais como, cancro dos pulmões e da laringe e o carcinoma hepatocelular, principalmente em pacientes infectados pelo VHC (Fishman *et al.*, 2006).

O CYP2D6 é o CYP polimórfico mais estudado, com mais de 100 variantes alélicas descritas. O seu fenótipo metabolizador lento (PM) ocorre em 5-10% dos Caucasianos, mas em menos de 1% dos Asiáticos e Africanos (Crettol *et al.*, 2010). O alelo mais comum entre os PM é o CYP2D6*4, com uma frequência alélica de aproximadamente 21% nas populações caucasianas. Os alelos CYP2D6*3, CYP2D6*5 e CYP2D6*6 apresentam frequências alélicas de 2,0%, 5,0% e 0,9%, respectivamente.

Neste estudo, as frequências alélicas do CYP2D6*4 para ambos os grupos de estudo (grupo de controlo, 16,3%; grupo de pacientes com HCC, 11,8%) são inferiores às referidas no estado da arte para os Caucasianos (21%) (Crettol *et al.*, 2010). Com os dados disponíveis para a população europeia, verifica-se que o grupo de controlo tem uma frequência alélica semelhante à da população espanhola (16,5%) (Crescenti *et al.*, 2007). Por sua

vez, o grupo de pacientes com HCC apresenta uma maior semelhança com a população turca (11,3%) (Ayanacioglu *et al.*, 1999; Crescenti *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo são discordantes com os de Fishman *et al.* (2006) que associam o CYP2D6*4 com a taxa acelerada de fibrose em pacientes com HCC. (Fishman *et al.*, 2006)

A frequência alélica do CYP2D6*6 foi de 0,5% no grupo de controlo e de 0% no grupo de pacientes com HCC; menor que a frequência mencionada por Crettol *et al.* para os Caucasianos, 0,9%. Dos dados existentes para a população europeia, constata-se que o grupo de controlo deste estudo apresenta semelhanças com a população holandesa (0,4%) (Crescenti *et al.*, 2007; Tamminga *et al.*, 2001).

No estudo do polimorfismo CYP2D6*4 também não se observaram diferenças significativas entre os diferentes genótipos e o tipo de resposta à terapêutica. O mesmo se verificou em relação ao estadió de fibrose ($p=0,174$), presença de esteatose ($p=0,593$) e grau de esteatose ($p=0,723$).

Contrariamente ao estudo de Fishman *et al.* (2006), no presente estudo verifica-se que os indivíduos metabolizadores lentos (PM) apresentam estadios de fibrose mais baixos. Num estudo referente a polimorfismos dos CYPs e à susceptibilidade para doença hepática crónica e carcinoma hepatocelular, o CYP2D6*4 foi considerado como factor protector relativamente às lesões hepáticas (Silvestri *et al.*, 2003) Tendo em conta a discordância de resultados, será necessário efectuar mais estudos e repensar a aplicabilidade desta variante para fins terapêuticos, na HCC (Fishman, *et al.*, 2006).

A resolução da infecção pelo VHC tem sido associada com respostas intensas e extensas das células T com a produção de IFN- γ , que estão diminuídas em pacientes com HCC (Dustin & Rice, 2007).

A OPN está envolvida na patogénese de várias doenças inflamatórias e fibróticas. Induz a acumulação das matrizes extracelulares (ECMs) através da ligação ao colagénio, fibronectina, e à osteocalcina, contribuindo para a fibrose dos tecidos (Honsawek *et al.*, 2010). Também estimula a proliferação das células T e induz as células T e os macrófagos a expressar outras citocinas Th1 durante a inflamação (Honsawek *et al.*, 2010). É responsável pela conversão da polaridade das células T *naïf* a Th1. Também tem sido associada ao aparecimento de doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide e

esclerose múltipla e doenças granulomatosas como a sarcoidose (Hummelshoj *et al.*, 2006; Niino *et al.*, 2003).

O polimorfismo no nucleótido-443 da região promotora do gene da OPN foi considerado útil como marcador para prever a resposta a terapêuticas com IFN em pacientes com HCC. No entanto, é necessária uma investigação mais aprofundada sobre a sua verdadeira relevância (Naito *et al.*, 2005).

Neste trabalho pretendia-se analisar se o polimorfismo genético C8090T do gene da osteopontina, conhecido por promover a polarização da resposta imunitária a Th1, estaria associado à HCC, conferindo susceptibilidade para a progressão de fibrose e explicando diferentes respostas à terapêutica. Neste estudo encontraram-se diferenças significativas nas frequências genótípicas do polimorfismo C8090T entre o grupo de pacientes com HCC e o grupo de controlo. A distribuição dos genótipos nos grupos de controlo e de pacientes portugueses foi: CC-10,3% e 23,3%; TT-32,0% e 33,3%; CT-57,7% e 43,3%, respectivamente.

No presente estudo verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de estudo e controlo ($p=0,018$) (Tabela 10). O genótipo CT, o mais frequente nos dois grupos, apresenta um menor risco relativo associado à HC (heterose negativa). Por outro lado, o genótipo CC é o que está associado a um maior risco relativo ($p=0,008$, $OR=3,02$, $IC\ 95\%= 1,371-6,634$). Existe uma relação linear estatisticamente significativa entre os genótipos da OPN e a susceptibilidade associada à HC ($p=0,006$).

No estudo do mesmo polimorfismo (C8090T) numa população japonesa com esclerose múltipla, o genótipo CC era mais prevalente no grupo de pacientes do que no grupo de controlo, estando associado com a susceptibilidade para esclerose múltipla. No grupo de controlo português, a distribuição dos genótipos do polimorfismo C8090T do gene da OPN é bastante diferente da população controlo japonesa. As frequências genótípicas nos grupos de controlo japonês e português são: CC- 48,4% e 10,3%; CT- 41,9% e 57,7%; TT- 9,7% e 32,0%, respectivamente; havendo diferenças estatisticamente significativas entre estas duas populações ($p=0,000$).

Ao comparar os dois grupos de pacientes, verifica-se que as frequências genótípicas nos indivíduos japoneses com EM e nos indivíduos portugueses

com HCC são: CC- 77,6% e 23,3%; CT- 15,5% e 43,3%; TT- 6,9% e 33,3%, respectivamente. Nos dois grupos japoneses, o genótipo CC é o mais frequente enquanto nas portuguesas é o CT (Niino *et al.*, 2003).

A distribuição alélica nos grupos de controlo português e japonês, em comparação com a referente à população americana é a seguinte: C- 43%, 69% e 24%; T- 57%, 31% e 76%, respectivamente. A população portuguesa, assim como, a americana apresentam uma maior frequência do alelo T, enquanto na população japonesa predomina o alelo C (Iwasaki *et al.*, 2001).

A falta de concordância com outros estudos pode ser devida, em parte, a diferenças no *background* dos polimorfismos nas diferentes etnias.

5.2. Resposta à terapêutica na HCC

As estatinas, mas principalmente a fluvastatina (FLV), têm apresentado um potencial papel terapêutico na infecção crónica pelo VHC (Bader *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2009). Neste contexto, os estudos baseiam-se em observações do ciclo de vida do VHC: os viriões circulam no plasma associados a partículas LDL; o LDLR e o SR-BI das HDLs facilitam putativamente a entrada do VHC nos hepatócitos; e a replicação do VHC depende da formação de um complexo de replicação em “rede membranas” (Bader *et al.*, 2008; Negro, 2010). As estatinas, agentes que bloqueiam a formação de precursores lipídicos para a prenilação, podem teoricamente interferir com a replicação viral (Ye *et al.*, 2003).

Bader *et al.* (2008) sugerem que a fluvastatina (FLV) actua no plasma circulante ligada a partículas lipovirais (LVPs) que consistem em LDLs, VLDLs e lipoproteínas apoB. O resultado desta ligação FLV-LVPs poderá interferir directamente com a capacidade do vírus em modular o sistema imunitário do hospedeiro. O complexo FLV-LVP poderá também apresentar maior dificuldade em entrar nos hepatócitos pelo LDLR, levando à redução da carga viral. No hepatócito, pensa-se que a fluvastatina se liga aos “rafts” lipídicos, possíveis locais de replicação dentro da célula (Bader *et al.*, 2008).

A associação do interferão- α com a fluvastatina em modelos experimentais exibiu fortes efeitos sinérgicos no que respeita à inibição da replicação do RNA viral, sugerindo que a FLV, em particular, mas

potencialmente outras estatinas, poderão ser usadas como um adjuvante à terapêutica com interferão- α (IFN- α) (Badder *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2006).

Sezaki *et al.* (2009), num estudo que abordou a eficácia da terapêutica com fluvastatina, IFN- α e ribavirina em pacientes infectados pelo VHC (genótipo 1b) com cargas virais elevadas, sugerem a utilização de FLV como adjuvante à terapêutica padrão, especialmente em indivíduos do sexo feminino com idade avançada que respondem pior à terapêutica (Sezaki *et al.*, 2009).

Sendo a FLV metabolizada pelo CYP2C9, o estudo das variantes genéticas deste CYP permite avaliar se a resposta a uma possível terapia coadjuvante com FLV, poderá estar relacionada ou não com o efeito da droga que pode resultar da variação genética individual (Badder *et al.*, 2008; Crettol *et al.*, 2010). Se um indivíduo é metabolizador rápido, apresenta um excesso de actividade enzimática, e o efeito da droga será sub-ótimo ou perdido (Lynch & Price, 2007).

Nos Caucasianos, os polimorfismos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 têm frequências de 11% e 7%, respectivamente. Enquanto os alelos mais raros CYP2C9*5, *6, *8, *9 e *11 têm uma maior prevalência nas populações africanas. Entre subgrupos étnicos de populações, podem existir pequenas diferenças nas frequências destes genótipos, sendo que a variante CYP2C9*2 está quase ausente nas populações africanas e asiáticas (Crettol *et al.*, 2010).

Neste estudo, as frequências genótípicas do CYP2C9*2 foram: CC- 66,1% e 73,9%; TT- 3,4% e 3,0%; CT- 30,5% e 23,2%, para os grupos de controlo e de pacientes. Para o CYP2C9*3, as frequências genótípicas são: AA- 55,0% e 61,7%; CC-1,8% e 2,9%; AC-43,1% e 35,4%. A cada genótipo corresponde um tipo de metabolizador: genótipos CC e AA - metabolizador extensivo (normal); genótipo TT e CC - metabolizador lento, CT e AC - metabolizadores intermediários com diminuição de actividade enzimática; para os CYP2C9*2 e *3 respectivamente (Lynch & Price, 2007). Os dois grupos são constituídos principalmente por indivíduos metabolizadores extensivos (normais). Como o grupo de pacientes com HCC, tem uma predominância de indivíduos metabolizadores extensivos, seguindo-se os metabolizadores intermediários que apresentam diminuição da actividade enzimática, e por fim com uma prevalência muito baixa, os metabolizadores rápidos; parece adequada a utilização de fluvastatina como adjuvante à terapêutica padrão,

não só tendo em vista a eliminação do vírus como também o melhoramento do perfil lipídico

A frequência alélica do CYP2C9*2 foi de 18,6% e 14,5%, nos grupos de controlo e de pacientes com HCC, respectivamente. Estas frequências são superiores à referida por Crettol *et al.*, para os Caucasianos (11%). A inexistência de estudos referentes à população portuguesa, ou a indivíduos com HCC, impossibilita a comparação com os resultados obtidos. Recorrendo aos dados disponíveis, verifica-se que a frequência alélica do grupo de controlo (18,6%) é semelhante à da população italiana (18,3%) (Margaglione *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002) e que a do grupo de pacientes (14,5%) é idêntica à da população holandesa (14,2%) (van der Weide *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002).

A frequência alélica do CYP2C9*3 foi de 23,4% e 20,6%, nos grupos de controlo e de pacientes com HCC, respectivamente. Estas frequências são, uma vez mais, superiores às mencionadas por Crettol *et al.*, para os Caucasianos (7%). A população espanhola é aquela que tem uma frequência alélica (16,2%) mais semelhante aos grupos estudados na população portuguesa (García-Martín *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002).

Entre os diferentes genótipos do CYP2C9*3 e a presença de esteatose existem diferenças significativas; a maioria dos indivíduos CYP2C9*3 tinha esteatose antes do tratamento ($p=0,041$).

Entre os indivíduos heterozigóticos para ambos os polimorfismos do CYP2C9 (haplótipo CTAC) e os portadores de outros haplótipos, existem diferenças significativas relativamente aos graus de esteatose e estadios de fibrose. Os indivíduos CYP2C9*2 e *3 apresentam graus de esteatose e estadios de fibrose inferiores antes da terapêutica. O haplótipo estudado parece ser protector em relação à existência de esteatose, e à progressão para graus e estadios mais avançados de esteatose e fibrose. A associação com a esteatose poderá estar relacionada com a intervenção do CYP2C9 no metabolismo de ácidos gordos (ácido araquidónico e ácido linolénico) (Kirchheiner *et al.*, 2004).

Chen & Raymond (2006) sugeriram que o CYP2C9*2 pode estar envolvido na carcinogénese do carcinoma hepatocelular, complicação associada à fibrose hepática (Chen & Raymond, 2006) Tendo isto em consideração, poderia esperar-se que os indivíduos CYP2C9*2 apresentassem

estádios de fibrose superiores. Contudo, neste estudo o mesmo não se verificou, não sendo possível inferir qualquer conclusão entre esta variante genética e a susceptibilidade para o desenvolvimento de estádios de fibrose mais avançados numa fase precoce da infecção.

6. Conclusão

O principal objectivo deste trabalho incidia no estudo da contribuição genética de polimorfismos genéticos dos CYP2C9, CYP2D6 e OPN na história natural (infecção, progressão e resposta à terapêutica) da hepatite C crónica (HCC).

Tendo por base a relação descrita entre o CYP2D6*4 e a previsão da taxa de progressão de fibrose hepática, esperava-se uma associação entre este polimorfismo e a presença de fibrose em estadios mais avançados. Contudo, neste estudo:

- Os resultados não são concordantes com a hipótese delineada, não sendo possível associar o CYP2D6*4 à progressão da fibrose, nem com outros aspectos relacionados com a história natural da HCC.

A discordância de resultados provenientes de vários estudos não torna viável a utilização desta variante genética como marcador na identificação da susceptibilidade para o desenvolvimento de cirrose numa fase precoce da infecção. São necessários estudos mais abrangentes em termos clínicos e demográficos, nos quais seja conhecido o tempo entre o diagnóstico da infecção e dos diferentes estadios de fibrose na progressão da doença.

A OPN está envolvida na patogénese de várias doenças inflamatórias e fibróticas. É conhecida a correlação de polimorfismos da OPN com a fibrose, a susceptibilidade para o desenvolvimento de cirrose hepática, e com a resposta à terapêutica na HCC. Neste estudo:

- Verificou-se que o genótipo CC do polimorfismo OPN C8090T estava associado a uma maior susceptibilidade na HCC e o genótipo CT a um factor protector. No entanto, não foi possível estabelecer qualquer relação entre este polimorfismo e a resposta à terapêutica.

As estatinas e principalmente a FLV têm um efeito supressor viral. Tendo em conta que a FLV é metabolizada pelo CYP2C9, considerou-se relevante o estudo das suas variantes como forma de avaliar se a resposta a uma futura terapia coadjuvante com FLV estaria relacionada com o efeito da estatina, que poderá resultar da variação genética individual. Neste contexto, verificou-se que:

- A utilização de FLV como adjuvante à terapêutica padrão parece adequada, dado que o grupo de pacientes com HCC é constituído predominantemente por metabolizadores extensivos (normais).

- A heterozigotia para as variantes genéticas CYP2C9*2 e CYP2C9*3 confere protecção em relação à existência de esteatose, e à progressão para graus mais avançados de esteatose e estadios de fibrose.

Neste trabalho foi feita uma abordagem genética e epidemiológica de uma amostra da população portuguesa: um grupo de pacientes com HCC e um grupo de indivíduos controlo. É importante salientar que, até à data, não está publicado qualquer estudo referente a estes polimorfismos na população portuguesa. Após a pesquisa bibliográfica verificou-se que também não estão disponíveis estudos a nível internacional que relacionem os polimorfismos CYP2C9*2, CYP2C9*3 e OPN C8090T com a HCC.

7. Bibliografia

Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease, *N Engl J Med*, **346**, 1221-1231.

Anzola, M. & Burgos, J.J. (2003) Hepatitis C virus (VHC): Model structure and genome organization. In *Expert Rev Mol Med*, vol. 5, pp.5, Cambridge University Press, Cambridge.

Appel, N., Schaller, T., Penin, F. & Bartenschlager, R. (2006) From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem* **281**, 9833-9836.

Asselah, T., Boyer, N. & Marcellin, P. (2003) Steatosis in hepatitis C: what does it mean? *Curr Hepat Rep* **2**. 137-144.

Asselah, T., Benhamou, Y. & Marcellin, P. (2009) Protease and polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C. *Liver Int* **29**, 57-67.

Asselah, T. & Marcellin, P. (2011) New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. *Liver Int* **31**, 68-77.

Aynacioglu, A.S., Sachse, C., Bozkurt, A., Kortunay, S., Nacak, M., Schröder T., Kayaalp, S.O., Roots, I. & Brockmüller, J. (1999) Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* **66**, 185-92.

Babaoglu, M.O., Yasar, U., Sandberg, M., Eliasson, E., Dahl, M. & Bozkurt, S.O.K.A. (2004) CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* **60**, 337-342.

Bader, T., Fazili, J., Madhoun, M., Aston, C., Hughes, D., Rizvi, S., Seres, K. & Hasan, M. (2008) Fluvastatin Inhibits Hepatitis C Replication in Humans. *Am J Gastroenterol* **103**, 1383-1389.

Bartosch, B. & Cosset, F.L. (2006) Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* **348**, 1-12.

Brunt, E.M. & Tiniakos, D.G. (2002) Steatosis, steatohepatitis: review of effects on chronic hepatitis C. *Curr Hepatitis Rep* **1**, 38-44.

Burlone, M.E. & Budkowska, A. (2009) Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* **90**, 1055-1070.

Chang, K.M. (2003) Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* **7**, 89-105.

Chen, J. & Raymond, K. (2006) Identification of CYP2C9*2 Allele in HepG2 Cell Line. *Int J Gastrointest* **37**, 79-83.

Ciriolo, M.R., Palamara, A.T., Incerpi, S., Lafavia, E., Bue, M.C., De Vito, P., & Rotilio, G. (1997) Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *J Biol Chem* **272**, 2700-2708.

Coban, S., Idilman, R., Erden, E. & Tüzün, A. (2011) Gamma-glutamyltranspeptidase in predicting sustained virological response in individuals with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterol* **58**, 1301-6.

Crescenti, A., Mas, S., Gassó, P., Baiget, M., Bernardo, M. & Lafuente, A. (2007) Simultaneous genotyping of CYP2D6*3, *4, *5 and *6 polymorphisms in a Spanish population through multiplex long polymerase chain reaction and minisequencing multiplex single base extension analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 992-7.

Crettol, S., Petrovic, N. & Murray, M. (2010) Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism. *Curr Pharm Des* **16**, 204-219.

Crispe, I.N. (2003) Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* **3**, 51-62.

Diao, H., Iwabuchi, K., Li, L., Onoe, K., Kaer, L.V., Kon, S., Saito, Y., Morimoto, J., Denhardt, D.T., Rittling, S. & Uede, T. (2008) Osteopontin regulates development and function of invariant natural killer T cells. *PNAS* **105**, 15884-15889.

Dubuisson, J., Helle, F. & Cocquerel, L. (2008) Early steps of the Hepatitis C Virus life cycle. *Cell Microbiol* **10**, 821-827.

Dustin, L.B. & Rice, C.M. (2007) Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* **25**, 71-99.

El-Kady, I.M. (2004) Assessment of humoral immune response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Egyp J Immunol* **11**, 141-7.

Erickson, A.L., Houghton, M., Choo, Q.L., Weiner, A.J., Ralston, R., Muchmore, E. & Walker, C.M. (1993) Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol* **151**, 4189-99.

Esteban, J.I., Sauleda, S. & Quer, J. (2008) The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* **48**, 148-162.

Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., De Maria, N., Floyd, R.A., Van Thiel, D.H. & Naccarato, R. (1999) Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic VHC infection. *Free Radic Biol Med* **27**, 1284-1291.

Fierbințeanu-Braticevici, C., Mohora, M., Crețoiu, D., Crețoiu, S., Petrișor, A., Usvat, R. & Ion, D.A. (2009) Role of oxidative stress in the pathogenesis of chronic hepatitis C (CHC). *Rom J Morphol Embryol* **50**, 407-412.

Fishman, S., Lurie, Y., Peretz, H., Morad, T., Grynberg, E., Blendis, L.M., Leshno, M., Brazowski E., Rosner, G., Halpern, Z. & Oren, R. (2006) Role of CYP2D6 polymorphism in predicting liver fibrosis progression rate in Caucasian patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* **26**, 279-284.

Freeman, A.J., Marinos, G., Ffrench, R.A. & Lloyd, A.R. (2001) Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* **79**,515-36.

Forde, K.A., Law, C., O'Flynn, R. & Kaplan, D.E. (2009) Do statins reduce hepatitis C RNA titers during routine clinical use? *World J Gastroenterol* **15**, 5020-5027.

García-Martín, E., Martínez, C., Ladero, J.M., Gamito, F.J.G. & Agúndez, J.A.G. (2001) High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasin population. *Eur J Clin Pharmacol* **57**, 47-49.

Gastaminza P., Kapadia, S.B. & Chisari, F.V. (2006) Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* **80**, 11074-11081.

Gao, B. (2005) Alcohol and hepatitis virus interactions in liver pathology. In: *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology* (Preedy, V.R. & Watson, R.R., eds), 819-32, Elsevier Academic, New York.

Golden-Mason, L. & Rosen, H.R. (2006) Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transpl* **12**, 363-72.

Gremion, C. & Cerny, A. (2005) Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol* **15**, 235-268.

Griffin, S.D.C. (2009) Plugging the holes in hepatitis C virus antiviral therapy. *PNAS* **106**, 12567-12568.

Haren, M.T., Li, M., Petkov, J. & McDermott, R.A. (2010) Alcohol, metabolic risk and elevated serum gamma-glutamyl transferase (GGT) in Indigenous Australians. *BMC Public Health* **10**, 454.

Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E. & Beaune, P. Human cytochromes P450. (1999) *Mol Aspects Med* **20**, 1-137.

Honsawek, S., Vejchapipat, P., Chongsrisawat, V., Thawornsuk, N. & Poovorawan, Y. (2010) Association of circulating osteopontin levels with clinical outcomes in postoperative biliary atresia. *Pediatr Surg Int* **27**, 283-288.

Hummelshoj, T., Ryder, L.P., Madsen, H.O., Odum, N., & Svejgaard, A. (2006) A functional polymorphism in the Eta-1 promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression. *Mol Immunol* **43**, 980-986.

Hwang, S.J. & Lee, S.D. (2011) Hepatic steatosis and hepatitis C: still unhappy bedfellows? *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 96-101.

Ikeda, M., Abe, K., Yamada, M., Dansako, H., Naka, K. & Kato, N. (2006) Different Anti-VHC Profiles of Statins and Their Potential for Combination Therapy With Interferon. *Hepatology* **44**, 117-125.

Ingelman-Sundberg, M. (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* **5**, 6-13.

Iwasaki, H., Shinohara, Y., Ezura, Y., Ishida, R., Kodaira, M., Kajita, M., Nakajima, T., Shiba, T. & Emi, M. (2001) Thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human osteopontin gene identified by sequencing of the entire gene in Japanese individuals. *J Hum Genet* **46**, 544-6.

Kawashima, R., Mochida, S., Matsui, A., YouLuTuZ, Y., Ishikawa, K. & Toshima, K. (1999) Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride

intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem. Biophys. Res Commun* **256**, 527-531.

Kirchheiner, J., Tsahuridu, M., Jabrane, W., Roots, I. & Brockmöller, J. (2004) The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Med* **1**, 63-84.

Koziel, M.J., Dudley, D., Wong, J.T., Dienstag, J., Houghton, M., Ralston, R. & Walker, B.D. (1992) Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* **149**, 3339-44.

Kramer, A.B., Ricardo, S.D., Kelly, D.J., Waanders, F., van Goor, H. & Navis, G. (2005) Modulation of osteopontin in proteinuria-induced renal interstitial fibrosis. *J Pathol* **207**, 483-492.

Letteron, P., Fromenty, B., Terris, B., Degott, C. & Pessayre, D. (1996) Acute and chronic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* **24**, 200-208.

Lorena, D., Darby, I.A., Gadeau, A.P., Leen, L.L., Rittling, S., Porto, L.C., Rosenbaum, J. & Desmoulière, A. (2006) Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. Altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol* **44**, 383-390.

Lynch, T. & Price, A. (2007) The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *Am Fam Physician* **76**, 391-396.

Machado, M.V. & Cortez-Pinto, H. (2011) Osteopontin: a missing link between hedgehog signaling and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **53**, 382-384.

MacParland, S.A., Pham, T.N., Guy, C.S. & Michalak, T.I. (2009) Hepatitis C virus persisting after clinically apparent sustained virological response to antiviral therapy retains infectivity in vitro. *Hepatology* **49**, 1431-41.

Margaglione, M., Colaizzo, D., D'Andrea, G., Brancaccio, V., Ciampa, A., Grandone, E. & di Minno, G. (2000) Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* **84**, 775-778.

Marinho, R.T., Moura, M.C., Giria, J.A., & Ferrinho, P. (2001) Epidemiological aspects of hepatitis C in Portugal. *J Gastroenterol Hepatol* **16**, 1076-1077.

Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**, 1089-1097.

Miyoshi, H., Moriya, K., Tsutsumi, T., Shinzawa, S., Fujie, H., Shintani, Y., Fujinaga, H., Goto, K., Todoroki, T., Suzuki, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Yotsuyanagi, H. & Koike, K. (2011) Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol* **54**, 432-8.

Miossec, P., Korn, T. & Kuchroo, V.K. (2009) Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *N Engl J Me*. **361**, 888-98.

Mochida, S., Hashimoto, M., Matsui, A., Naito, M., Inao, M., Nagoshi, S., Nagano, M., Egashira, T., Mishiro, S. & Fujiwara, K. (2004) Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C patients. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 1079-85.

Moradpour, D., Penin F. & Rice, C.M. (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* **5**, 453-463.

Naito, M., Matsui, A., Inao, M., Nagoshi, S., Nagano, M., Ito, N., Egashira, T., Hashimoto, M., Mishiro, S., Mochida, S. & Fujiwara, K. (2005) SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* **40**,381-88.

Negro, F. (2006) Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* **12**, 6756-6765.

Negro, F. (2010) Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* **59**, 1279-1287.

Neuvonen, P.J., Backman, J.T. & Niemi, M. (2008) Pharmacokinetic Comparison of the Potential Over-the-Counter Statins Simvastatin, Lovastatin, Fluvastatin and Pravastatin. *Clin Pharmacokinet* **47**, 463-474.

Niino, M., Kikuchi, S., Fukazawa, T., Yabe, I. & Tashiro, K. (2003) Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* **136**, 125-9.

Okamoto, H. (2007) Osteopontin and cardiovascular system. *Mol Cell Biochem* **300**, 1-7.

Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Huster, K.M., Jansson, M., Granucci, F., Shim, D.J., Wucherpfennig, K.W. & Canto, H. (2001) Analysis of the Relationship between Viral Infection and Autoimmune Disease. *Immunity* **15**, 137-147.

Pezacki, J.P., Singaravelu, R. & Lyn, R.K. (2010) Host-virus interactions during hepatitis C virus infection: a complex and dynamic molecular biosystem. *Mol BioSyst* **6**, 1131-1142.

Ramaiah, S.K. & Rittling, S. (2008) Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci* **103**, 4-13.

Raimondi, S., Bruno, S., Mondelli, M.U. & Maisonneuve, P. (2009) Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J Hepatol* **50**, 1142-54.

Renkl, A.C., Wussler, J., Ahrens, T., Thoma, K., Kon, S., Uede, T., Martin, S.F., Simon, J.C. & Weiss, J. (2005) Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood* **106**, 946-55.

Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Abid, K., Giostra, E., Malé, P.J., Mentha, G., Spahr, L., Zarski, J.P., Borisch, B., Hadengue, A. & Negro, F. (2000) Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* **33**, 106-15.

Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. & Roots, I. (1997) Cytochrome P450 2D6 Variants in a Caucasian Population: Allele Frequencies and Phenotypic Consequences. *Am J Hum Genet* **60**, 284-295.

Safdar, K. & Schiff, E.R. (2004) Alcohol and hepatitis C. *Semin Liver Dis* **24**, 305-15.

Sanai, F.M., Benmoussa, A., Al-Hussaini H., Ashraf, S., Alhafi, O., Abdo, A.A., Alameri, H.F., Akbar, H.O. & Bzeizi, K.I. (2008) Is serum alanine transaminase level a reliable marker of histological disease in chronic hepatitis C infection? *Liver Int* **28**, 1011-8.

Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahil, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., Clore, J.N. (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**, 1183-1192.

Sato, T., Nakai, T., Tamura, N., Okamoto, S., Matsuoka, K., Sakuraba, A., Fukushima, T., Uede, T. & Hibi, T. (2005) Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut* **54**, 1254-1262.

Serlin, D.M., Kuang, P.P., Subramanian, M., O'Regan, A., Li, X., Berman, J.S. & Goldstein, R.H. (2006) *J Cell Biochem* **97**, 519–529.

Shin, H.D., Park, B.L., Cheong, H.S., Yoon, J.H., Kim, Y.J. & Lee, H.S. (2007) SPP1 polymorphisms associated with HBV clearance and HCC occurrence. *Int J Epidemiol* **36**, 1001-1008.

Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K.S. & Glimcher, L.H. (2006) Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* **7**, 498-506.

Silvestri, L., Sonzogni, L., De Silvestri, A., Gritti, C., Foti, L., Zavaglia, C., Leverì, M., Cividini, A., Mondelli, M.U., Civardi, E. & Silini, E.M. (2003) CYP enzyme polymorphisms and susceptibility to HCV-related chronic liver disease and liver cancer. *Int J Cancer* **104**, 310-7.

Simmonds, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. (2004) *J Gen Virol* **85**, 3173-3188.

Shepard, C.W., Finelli, L. & Alter, M.J. (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* **5**, 558-67.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G. & Glimcher, L.H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Stemmann, C., Satoskar, A.R., Sleckman, B.P. & Glimcher, L.H. (2002) Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-42.

Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L. & Glimcher, L.H. (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* **21**, 713-758.

Tamminga, W.J., Wemer, J., Oosterhuis, B., de Zeeuw, R.A., Leij, L.F.M.H. & Jonkman, J.H.G. (2001) The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch samples. *Eur J Clin Pharmacol* **57**, 717-22.

Tang, H. & Gris , H. (2009) Cellular and molecular biology of VHC infection and hepatitis. *Clin Sci* **117**, 49-65.

Tardif, K.D., Waris, G. & Siddiqui, A. (2005) Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* **13**, 159-163.

Teixeira, R., Marcos, L.A. & Friedman, S.L. (2007) Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis: New insights into antifibrotic therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* **37**, 579-595.

van der Weide, J., Steijns, L.S.W., van der Weelden, M.J.M. & de Haan, K. (2001) The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics* **11**, 287-291.

Verbeeck, J., Maes, P., Lemey, P., Pybus, O.G., Wollants, E., Song, E., Nevens, F., Fevery, J., Delport, W., Van der Merwe, S. & Van Rans, M. (2006) Investigating the origin and spread of hepatitis C virus genotype 5a. *J Virol* **80**, 4220-6.

Walsh, M.J., Jonsson, J.R., Richardson, M.M., Lipka, G.M., Purdie, D.M., Clouston, A.D. & Powell, E.E. (2006) Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut* **55**, 529-535.

Webster, G., Barnes, E., Brown, D. & Dusheiko, G. VHC genotypes - role in pathogenesis of disease and response to therapy. (2000) *Baillière's Clin. Gastroenterol.* **14**, 229-240.

Wohnsland, A., Hofmann, W.P. & Sarrazin, C. (2007) Viral Determinants of Resistance to Treatment in Patients with Hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* **20**, 23-38.

Wong, D.K., Dudley, D.D., Afdhal, N.H., Dienstag, J., Rice, C.M., Wang, L., Houghton, M., Walker & B.D., Koziel, M.J. (1998) Liver-derived CTL in hepatitis C virus infection: breadth and specificity of responses in a cohort of persons with chronic infection. *J Immunol* **160**, 1479-88.

Xanthou, G., Alissafi, T., Semitekolou, M., Simoes, D.C., Economidou, E., Gaga, M., Lambrecht, B.N., Lloyd, C.M. & Panoutsakopoulou, V. (2007) Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat Med* **13**, 570-578.

Xie, H.G., Prasad, C.H., Kim, R.B. & Stein, M. (2002) CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliver Rev* **54**, 1257-1270.

Ye, J., Wang, C., Sumpter, R.Jr., Brown, M.S., Goldstein, J.L. & Gale, M.Jr. (2003) Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *PNAS* **100**, 15865-15870.

Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K. & Schwab, M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* **392**, 1093-1108.

Fontes electrónicas

Gene Ruler™ DNA Ladders. Fermentas Molecular Biology Tools. 2011. [20 Set. 2011] Disponível em <URL: "www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis">.