

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Efeito da Variabilidade Genética e da
Concentração Plasmática do Fator de
Crescimento de Transformação- β 1 (TGF- β 1)
na Fibrogénese Hepática, Resposta à
Terapêutica Antiviral e História Natural da
Hepatite C Crónica (HCC)**

Carla Sofia Rainho Fernandes

DISSERTAÇÃO

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2013

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Efeito da Variabilidade Genética e da
Concentração Plasmática do Fator de
Crescimento de Transformação- β 1 (TGF- β 1)
na Fibrogénese Hepática, Resposta à
Terapêutica Antiviral e História Natural da
Hepatite C Crónica (HCC)**

Carla Sofia Rainho Fernandes

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

Orientador Externo: Professor Doutor Manuel Bicho (manuelbicho@fm.ul.pt)

Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa

Orientador Interno: Professora Doutora Ângela Inácio (mainacio@fc.ul.pt)

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2013



AGRADECIMENTOS

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

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

À Professora Doutora Ângela Inácio, por ter aceite orientar este projeto a partir da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

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

À Dra. Joana Ferreira por todo o apoio e disponibilidade constantes, por todos os ensinamentos e, principalmente, pela confiança demonstrada no meu trabalho.

Ao serviço de Gastrenterologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa da Professora Doutora Fátima Serejo da consulta de Hepatologia, por me ter possibilitado desenvolver este trabalho e pela disponibilidade no aconselhamento.

A todos os colaboradores do Laboratório de Genética, Andreia Matos, Ângela Gil, Conceição Afonso e D. Manuela pelo apoio, disponibilidade e companheirismo.

Aos meus colegas de laboratório que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho da melhor forma possível.



A todos os meus colegas e amigos, pelo companheirismo e dedicação, especialmente à Noélia e à Inês.

Ao Nuno, que numa fase final desta etapa, me deu apoio e motivação para terminar o meu trabalho.

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



RESUMO

Estado da arte: O vírus da Hepatite C (VHC) infeta cerca de 170 milhões de pessoas, é a principal causa de doença hepática crónica, cirrose, esteatose hepática e carcinoma hepatocelular, em todo o mundo.

O TGF- $\beta 1$ é uma citocina regulatória com efeitos multifuncionais em processos celulares biológicos, incluindo a fibrogénese hepática. Alguns estudos mostraram que os polimorfismos no gene do TGF- $\beta 1$ parecem modular a quantidade de citocina, afetando a severidade da doença.

Objetivos: Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência dos polimorfismos -509C>T e 29T>C do TGF- $\beta 1$, no prognóstico da HCC e avaliar a importância destas variantes na resposta à terapêutica antiviral.

Métodos: Numa amostra de 244 pacientes com HCC (158 homens e 86 mulheres) com idade média de 43 anos [16-81] e IMC médio de 25 Kg/m² [17-41] em que 159 indivíduos (65.2%) foram tratados com terapêutica standard (Interferão Peguilado + Ribavirina), sendo 21,4%-não respondedores (NR), 15,1%-recidivas (RR) e 63,5%-resposta sustentada (RS), foram analisados os polimorfismos -509C>T e 29T>C do TGF- β por PCR-RFLP. Estes foram relacionados com parâmetros clínicos e histológicos analisados durante o acompanhamento clínico dos doentes pelo seu médico assistente, nomeadamente a carga viral (VHC-RNA), o genótipo do vírus, o grau de esteatose e fibrose hepáticas, que foram definidos por biópsia hepática (Peter Scheuer score) e alguns parâmetros clínicos (AST, ALT, GGT, perfil lipídico, metabolismo do ferro, insulina, glicémia, peptídeo-C e HOMA)



Resultados: Os portadores do alelo C do polimorfismo -509C>T demonstraram níveis mais baixos de VHC-RNA ($p=0.037$) e os detentores do alelo T do polimorfismo 29T>C apresentam níveis reduzidos de γ -GT e haptoglobina ($p=0.030$; $p=0.022$). Comparando dados clínicos e histológicos, antes e depois da terapêutica antiviral, para pacientes com resposta viral sustentada foram encontrados níveis mais elevados de colesterol nos portadores do alelo C do -509C>T e nos detentores do alelo T do 29T>C ($p=0.000$); uma diminuição na Ferritina para os portadores do alelo C no -509C>T ($p=0.014$) e um aumento da fibrose apenas nos detentores do alelo T no 29T>C ($p=0.01$), após terapêutica standard, comparando com indivíduos NR.

Conclusões: Como conclusões deste estudo destacam-se a influência de ambos os polimorfismos (-509C>T e 29T>C) do TGF- $\beta 1$ estudados, no desenrolar da infeção por VHC. Verificou-se uma associação entre os alelos normais de ambos os polimorfismos (C e T) e bons fatores preditivos para uma resposta sustentada à terapêutica antiviral, em pacientes submetidos a terapêutica standard.

Palavras-chave: Hepatite C, VHC, TGF- $\beta 1$, Polimorfismos



ABSTRACT

Background: The Hepatitis C virus (HCV) infects about 170 million people, is the leading cause of chronic liver disease, cirrhosis, hepatocellular carcinoma and liver steatosis, worldwide.

TGF- β 1 is a regulatory cytokine with multifunctional effects in biological cellular processes, including liver fibrogenesis. Some studies have shown that polymorphisms in TGF- β 1 gene appear to modulate the amount of cytokine, affecting disease severity.

Aims: The objectives of this study were to evaluate the influence of -509C>T and 29T>C TGF- β 1 polymorphisms on the prognosis of HCC and to assess the importance of these variants in response to antiviral therapy.

Methods: On one sample of 244 CHC patients (158 males and 86 females), with middle age of 43 [16-81] years and body mass index of 25 [17-41] Kg/m²; 159 individuals (65.2%) were treated with antiviral SOC therapy (Pegylated Interferon + Ribavirin), being 21,4%- non response (NR), 15,1%- relapse (RR) and 63.5%- sustained viral response (SVR), TGF- β -509C>T and 29T>C polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP. These were correlated with clinical and histological parameters analyzed during the clinical follow-up of patients by their physician, including viral load (HCV-RNA), virus genotype, steatosis and fibrosis stage, that were assessed by liver biopsy (Peter Scheuer score) and some clinical parameters (AST, ALT, GGT, lipid profile, iron metabolism, insulin, glucose, peptide-C and HOMA).

Results: Carriers of -509C>T allele C showed lower baseline levels of HCV-RNA ($p=0.037$) and carriers of 29T>C allele T presented lower baseline levels of γ -GT and haptoglobin ($p=0.030$; $p=0.022$). Only for SVR patients the comparison of clinical and



histological data before and after treatment showed: higher levels of cholesterol in -509C>T allele C and 29T>C allele T carriers ($p=0.000$), significant decrease of Ferritin in -509C>T allele C carriers ($p=0.014$) and an improvement of fibrosis only in 29T>C allele T carriers ($p=0.01$) after SOC, comparing with NR.

Conclusions: This study highlight the influence of both TGF- $\beta 1$ polymorphisms studied (-509C>T and 29T>C) in the course of HCV infection. There was an association between normal alleles of both polymorphisms (C and T) and good predictive factors and the response to antiviral therapy.

Keywords: Hepatitis C, HCV, TGF- $\beta 1$, Polymorphisms



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e bioquímicas da população HCC estudada.

Tabela 2 – Frequência do tipo de Hepatite na população HCC estudada.

Tabela 3 – Características fisiopatológicas na população HCC estudada.

Tabela 4 – Frequência do genótipo do VHC na população HCC estudada.

Tabela 5 – Frequência do tipo de Resposta à Terapêutica antiviral na população HCC estudada (N=159).

Tabela 6 - Polimorfismos estudados: -509C>T e 29T>C

Tabela 7 – *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse.

Tabela 8 – Condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR.

Tabela 9 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo do polimorfismo através da técnica de RFLP.

Tabela 10 – *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse.

Tabela 11 – Condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR.

Tabela 12 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo do polimorfismo através da técnica de RFLP.

Tabela 13 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo C>T na posição -509 do promotor do TGF- β na população HCC estudada.

Tabela 14 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β na população HCC estudada.

Tabela 15 – Avaliação da influência do polimorfismo C>T na posição -509 do promotor do TGF- β nos parâmetros bioquímicos basais estudados na população HCC.



Tabela 16 – Avaliação da influência dos genótipos CC+CT e TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do TGF- β nos valores de RNA e de Ferritina da população HCC.

Tabela 17 – Avaliação da influência do polimorfismo C>T na posição -509 do promotor do TGF- β nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica na população HCC.

Tabela 18 – Avaliação da influência dos genótipos CC e CT+TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do promotor do TGF- β no grau de fibrose da população HCC.

Tabela 19 – Avaliação da influência dos genótipos CC+CT e TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do promotor do TGF- β no grau de fibrose da população HCC.

Tabela 20 – Avaliação da influência do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β nos parâmetros bioquímicos basais estudados.

Tabela 21 – Avaliação da influência dos genótipos TT+TC e CC, do polimorfismo T>C, na posição 29 do TGF- β na concentração de Haptoglobina e nos valores do enzima hepático Gama GT da população HCC.

Tabela 22 – Avaliação da influência do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica na população HCC.

Tabela 23 - Avaliação da relação da concentração de TGF- β com os genótipos do TGF- β -509C>T e 29T>C.

Tabela 24- Avaliação da relação da concentração de TGF- β com as variáveis discretas (fibrose, esteatose, inflamação e resposta à terapêutica).

Tabela 25- Fibrose (Fibroscan) antes e depois da terapêutica em indivíduos RS.

Tabela 26- Avaliação da influência do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β na fibrose, antes e depois da terapêutica, na população HCC.



Tabela 27- Avaliação da influência da terapêutica nas variáveis contínuas em indivíduos com resposta sustentada.

Tabela 28- Avaliação da influência dos genótipos CC, CT e TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do promotor do TGF- β , nos parâmetros bioquímicos basais estudados, em indivíduos com resposta sustentada, antes e depois da terapêutica.

Tabela 29- Avaliação da influência dos genótipos TT, TC e CC, do polimorfismo T>C, na posição 29 do TGF- β , nos parâmetros bioquímicos basais estudados, em indivíduos com resposta sustentada, antes e depois da terapêutica.

Tabela 30- Avaliação da influência dos parâmetros bioquímicos basais estudados (VHC-RNA e Gama GT) na resposta à terapêutica.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produtos amplificados por PCR-RFLP para deteção da variante alélica TGF- β -509C>T, visualizados em gel de agarose a 3%.

Figura 2: Produtos amplificados por PCR-RFLP para deteção da variante alélica TGF- β 29T>C, visualizados em gel de agarose a 3%.



LISTA DE SIGLAS

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GT – *γ -Glutamyl Transpeptidase*

HCC – Hepatite C Crónica

HDL – *High Density Lipoprotein*

HOMA – *Homeostasis Model Assessment*

IFN- α Peguilado – Interferão- α Peguilado

IMC – Índice de massa corporal

LDL – *Low Density Lipoprotein*

MEC – Matriz extracelular

PCR-RFLP – Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (do inglês *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RBV - Ribavirina

RNA – Ácido ribonucleico

SNP – Polimorfismo de nucleótido único (do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*)

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

Tampão TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TGF- β – Fator de Crescimento de Transformação β (do inglês *Transforming Growth Factor β*)

UV – Ultravioleta

VHC – Vírus da Hepatite C

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VLDL- *Very low Density Lipoprotein*



ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hepatite C.....	1
1.2 TGF- $\beta 1$	2
1.3 Fibrogénese Hepática	3
1.4 Polimorfismos genéticos do TGF- β	4
1.4.1. TGF- β -509C>T	5
1.4.2. TGF- β 29T>C	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 População de estudo.....	7
3.1.1. Características demográficas e bioquímicas.....	7
3.1.2. Características fisiopatológicas e resposta à terapêutica.....	8
3.2 Critérios de Exclusão	10
3.3 Extração de DNA genómico	11
3.4 Quantificação do DNA.....	11
3.5 Polimorfismos estudados	11
3.5.1. Deteção da variante alélica TGF- β -509C>T.....	12
3.5.1.1 Amplificação do DNA genómico	12
3.5.1.2 Genotipagem dos indivíduos	13



3.5.2.	Deteção da variante alélica TGF- β 29T>C.....	14
3.5.2.1	Amplificação do DNA genómico	14
3.5.2.2	Genotipagem dos indivíduos	15
3.6	Doseamento da concentração plasmática do TGF- β por ELISA.....	16
3.7	Análise Estatística	17
4.	RESULTADOS	18
4.1	Genotipagem do TGF- β e identificação dos polimorfismos.....	18
4.2	Influência do genótipo do TGF- β nos parâmetros estudados	18
4.2.1.	Avaliação da influência do polimorfismo -509C>T nos parâmetros bioquímicos basais	19
4.2.2.	Avaliação da influência do polimorfismo -509C>T nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica	21
4.2.3.	Avaliação da influência do polimorfismo 29T>C nos parâmetros bioquímicos basais	23
4.2.4.	Avaliação da influência do polimorfismo 29T>C nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica	25
4.3	Influência da concentração do TGF- β nos parâmetros estudados.....	26
4.4	Influência da terapêutica nas variáveis discretas (fibrose, esteatose e inflamação) em indivíduos com resposta sustentada	28
4.5	Influência da terapêutica nas variáveis contínuas em indivíduos com resposta sustentada	30



4.6	Influência dos parâmetros estudados na resposta à terapêutica antiviral ..	32
5.	DISCUSSÃO	33
5.1	Genotipagem do TGF- β e identificação dos polimorfismos.....	33
5.2	Influência do genótipo do TGF- β nos parâmetros estudados	34
5.3	Avaliação dos parâmetros bioquímicos e características fisiopatológicas, antes e depois da terapêutica antiviral, em indivíduos com resposta sustentada.	36
5.4	Influência dos parâmetros estudados na resposta à terapêutica antiviral ..	39
6.	CONCLUSÃO	40
7.	BIBLIOGRAFIA.....	41



1. INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite C

A Hepatite C é uma doença do fígado causada pelo vírus da hepatite C (VHC). A doença pode variar em severidade desde um leve mal-estar durando algumas semanas até uma séria condição ao longo da vida que pode levar a cirrose ou cancro no fígado. ^{1,2}

O desenvolvimento de fibrose avançada ou a cirrose são as consequências mais significativas da infeção pelo VHC. A taxa de desenvolvimento de fibrose varia substancialmente entre os indivíduos e é influenciada por vários fatores incluindo género, idade na altura da infeção, consumo de álcool e esteatose hepática. ³

O VHC infeta cerca de 170 milhões de pessoas em todo o mundo. A infeção crónica ocorre em 50-80% dos casos e é a maior causa de cirrose e carcinoma hepatocelular e a principal causa de transplante de fígado. O VHC é um membro da família *Flaviviridae*, tem RNA de cadeia simples e é relativamente pequeno (55nm-65nm). ⁴⁻²⁶

A Hepatite C é normalmente transmitida através da exposição a sangue infetado. Esta pode ocorrer através de transfusões de sangue contaminado, derivados do sangue ou órgãos; injeções com seringas contaminadas, uso de drogas injetáveis, transmissão mãe-filho. Pode também ser transmitida por relações sexuais com uma pessoa infetada ou pela partilha de material contaminado com sangue infetado. ^{1,12,14,26,27}



Os países com maiores taxas de infeção crónica são o Egipto (15%), Paquistão (4,8%) e China (3,2%). O principal modo de transmissão nestes países é atribuído a injeções inseguras usando material contaminado. ¹

O período de incubação para a Hepatite C é de 2 semanas a 6 meses. Após a infeção inicial, aproximadamente 80% das pessoas não apresentam sintomas. Aqueles que apresentam podem exibir febre, fadiga, diminuição de apetite, náuseas, vômitos, dores abdominais, urina escura, fezes cinzentas, dores nas articulações e icterícia. ^{1,11}

Aproximadamente 75-85% dos novos infetados desenvolvem a doença crónica, 5-20% desenvolvem cirrose e 1-5% morrem de cirrose ou cancro de fígado. Em 25% dos pacientes com cancro de fígado a principal causa é a Hepatite C. ^{1,11}

A maioria dos infetados não apresenta sintomas sendo o diagnóstico da infeção aguda frequentemente perdido. O diagnóstico da infeção crónica é feito quando os anticorpos para a hepatite C estão presentes no sangue durante mais de seis meses. ^{1,2,11}

A terapêutica standard com interferão-alfa leva a uma resposta sustentada em apenas 10-20% dos pacientes. Estudos recentes demonstraram um aumento dos níveis de resposta sustentada para a combinação de interferão-alfa e ribavirina, em cerca de 40% dos pacientes. ^{5-9,11,12,18-20}

1.2 TGF- $\beta 1$

As citocinas desempenham um papel vital na capacidade do corpo para combater as infeções virais determinando o tipo de resposta imunitária desencadeada e inibindo a proliferação viral. Variações genéticas no hospedeiro como polimorfismos de



nucleotídeo único (SNPs), nos genes das citocinas, podem afetar os níveis de produção do VHC. ¹⁰

O Fator de Crescimento de Transformação β (TGF- β) é uma importante citocina para o crescimento e diferenciação celulares, angiogénese, formação de matriz extracelular e regulação da resposta imunitária. É libertado durante as fases de inflamação, regeneração dos tecidos e fibrogénese. ^{10,16,22,28-32}

A superfamília do TGF- β consiste em 3 principais isoformas, nomeadamente TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ e TGF $\beta 3$. O TGF- $\beta 1$ é uma proteína dimérica que atua como hormona ou localmente como um regulador da proliferação, diferenciação, produção de matriz extracelular e morte celular. ^{10,29,33}

Uma vez que as citocinas regulam a resposta imunitária, os polimorfismos nos seus genes ou variações na sua expressão podem afetar a suscetibilidade de um indivíduo para doenças infecciosas. ¹⁰

1.3 Fibrogénese Hepática

A fibrose hepática resulta de uma lesão crónica no fígado em conjunto com a acumulação excessiva de proteínas da matriz extracelular (MEC) incluindo colagénio. A acumulação de proteínas da MEC distorce a arquitetura hepática formando uma cicatriz fibrosa. ^{13,22,23,31,34-38}

A síntese de proteínas da MEC ocorre nas células estreladas hepáticas. A inibição e regressão da fibrose estão associadas à redução da produção excessiva de proteínas da MEC e degradação das já produzidas. ^{4,36-38}



A fibrólise consiste na remoção do excesso de MEC por enzimas proteolíticas das quais se destacam as metaloproteinases da matriz. A fibrogénese hepática é caracterizada por um aumento da síntese de MEC e uma diminuição da secreção e atividade das metaloproteinases da matriz através do aumento dos inibidores das metaloproteinases. ^{16,23,31}

A fibrogénese é um processo complexo e dinâmico mediado pela necroinflamação e pela ativação das células estreladas hepáticas. ¹³

O TGF- β 1 é a mais importante citocina profibrogénica participando em vários dos acontecimentos que levam à fibrose hepática, tais como, a ativação das células estreladas hepáticas, apoptose de hepatócitos, regulação da produção e deposição de MEC, e na expressão de outros mediadores profibrogénicos. ^{15,16,21-23,25,30,31,33,34,37-40}

Dado que o TGF- β 1 ocupa um papel central na fibrogénese hepática, é possível que também algumas variantes na sequência de DNA do TGF- β 1 possam conferir um risco genético para a fibrose hepática. ⁴¹

1.4 Polimorfismos genéticos do TGF- β

As citocinas desempenham um papel importante na regulação da resposta imunitária. Na infeção pelo vírus da hepatite C (VHC), a produção de níveis inapropriados de citocinas parece contribuir para a persistência viral e afetar a resposta à terapêutica. ⁴²

Os genes das citocinas são polimórficos em determinadas regiões e tem sido demonstrado que algumas mutações localizadas dentro de regiões codificantes/reguladoras afetam a expressão geral e secreção das citocinas. ⁴²



1.4.1. TGF- β -509C>T

Salam et al. refere que uma substituição de bases C-T, na posição -509 no promotor do gene do TGF- β 1 aumenta a transcrição deste gene e a concentração plasmática desta citocina. ⁴³

Kimura et al. demonstrou que no polimorfismo -509C>T do TGF- β 1 o alelo -509C tinha uma atividade do promotor ~30% mais baixa e que esta diminuição potenciava uma maior taxa de eliminação do VHC. ⁴⁴

1.4.2. TGF- β 29T>C

Zein et al. refere que a transição (T-C) na posição +29, resultando na substituição do aminoácido leucina por prolina no codão 10, pode resultar numa maior eficiência de exportação da nova proteína sintetizada com conseqüente aumento dos níveis séricos desta citocina. ⁴⁵

Gewaltig et al. concluiu que a presença de prolina no codão 10 estava associada a uma progressão mais rápida da fibrose. ⁴⁶



2. OBJETIVOS

Pretendeu-se com este projeto aprofundar o estudo do papel da variação genética e da concentração plasmática do TGF- β 1 na progressão da Hepatite C Crónica (HCC) e na resposta à terapêutica antiviral, através da avaliação de 2 polimorfismos genéticos deste gene (-509C>T, 29T>C) por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) e do doseamento da concentração plasmática desta citocina por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Outro dos objetivos deste estudo foi estabelecer uma relação com as manifestações clínicas da doença: esteatose, fibrose, necro-inflamação (*Grading*), genótipo viral e resposta à terapêutica.

Neste estudo, foram ainda avaliadas as características demográficas e bioquímicas dos doentes com HCC, que incluem IMC, idade, perfil lipídico (HDL, LDL, triglicéridos e colesterol total), parâmetros do metabolismo do ferro (ferro, transferrina, ferritina, ceruloplasmina, haptoglobina e saturação), enzimas hepáticas (fosfatase alcalina, AST, ALT, Gama GT), níveis de insulina e glucose (insulina, glicémia, HOMA) e sobrecarga oxidante (GSSG, GSH_{Total} e GSH_{Total}/GSSG) bem como a carga viral e a forma de transmissão da infeção.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População de estudo

A População incluída neste estudo abrange indivíduos com Hepatite C Crónica (HCC), seguidos na sua maioria pela Professora Doutora Fátima Serejo na consulta de Hepatologia do Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte - Hospital de Santa Maria. A HCC foi identificada pela presença de RNA do vírus no sangue periférico e anti-VHC há mais de 6 meses e todos os doentes incluídos foram submetidos a avaliação clínica e colheita de sangue periférico, com consentimento informado.

3.1.1. Características demográficas e bioquímicas

As características demográficas e bioquímicas dos 244 doentes com HCC utilizados no estudo estão descritas na Tabela 1. A população HCC estudada é maioritariamente masculina, incluindo 158 indivíduos do sexo masculino (64,8%) e 86 do sexo feminino (35,2%).



Tabela 1 - Características demográficas e bioquímicas da população HCC estudada.

VARIÁVEIS NORMAIS	N	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	
TGF- β (pg/mL)	83	1289,43	585,33	
Transferrina (μ g/dL)	110	307,05	70,54	
Haptoglobina	61	97,21	38,02	
VARIÁVEIS NÃO NORMAIS	N	MEDIANA	MÍN.	MÁX.
Idade (anos)	243	43,0	16,0	81,0
VHC-RNA (UI)	211	305689,286	0	10000000,0
IMC (Kg/m ²)	226	25,0	17,0	41,0
AST (UI/L)	231	49,0	16,0	654,0
ALT (UI/L)	232	80,0	15,0	505,0
Fosfatase Alcalina (μ g/dL)	197	66,0	27,0	395,0
Gama GT (UI/L)	229	44,0	10,0	1139,0
Saturação (%)	136	0,3718	0,08	42,0
Ferritina (ng/mL)	128	177,0	18,0	1388,0
Triglicéridos (mmol/L)	213	1,08	0,3	4,2
Glicémia (mg/dL)	144	85,5	61	288
Insulina (μ U/mL)	100	10,4	1,6	81,2
HOMA (μ U/mL.mg/dL)	99	2,14	0,3	19,7
Colesterol Total (mmol/L)	214	4,3	1,6	8,8
HDL (mmol/L)	139	1,27	0,1	3,0
LDL (mmol/L)	123	2,5	0,5	5,6
Ferro (μ g/dL)	145	118,0	30,0	349,0
Ceruloplasmina (mg/dL)	58	34,5	21,0	81,0

Teste Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$), correção de Lilliefors ($p = 0,2$)

3.1.2. Características fisiopatológicas e resposta à terapêutica

No grupo de estudo destacam-se diferentes modos de transmissão da infeção:

Tabela 2 – Frequência do tipo de Hepatite na população HCC estudada.

TRANSMISSÃO DA INFEÇÃO	N (%)
Pós-transfusional	48 (19,7)
Esporádica	73 (29,9)
Sexual	7 (2,9)
Parentérica	98 (40,2)
Vertical	3 (1,2)



As características fisiopatológicas da população HCC estudada estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características fisiopatológicas na população HCC estudada.

PARÂMETRO	ESTADIO	N (%)
Fibrose na biópsia (Staging) (N=169)	F1/2	128 (75,7)
	F3/4	41 (24,3)
Fibrose (Fibroscan) (N=155)	F1/2 (<5,4+5,4-8,1)	110 (71)
	F3/4 (8,2-10+>10,1)	45 (29)
Esteatose (N=135)	Com	97 (71,9)
	Sem	38 (28,1)
Grau de Esteatose (N=97)	Ligeira (1 e 2)	69 (71,1)
	Moderada e Grave (3 e 4)	28 (28,9)
Necro-inflamação (Grading) (N=158)	Ligeira (0-4)	37 (23,4)
	Moderada (4-6)e Intensa (>6)	121 (76,6)

Neste grupo de doentes, os indivíduos foram divididos segundo o genótipo do VHC, agrupando-se os vários subtipos.

Tabela 4 – Frequência do genótipo do VHC na população HCC estudada.

GENÓTIPO DO VÍRUS	N (%)
1 (1a, 1b, 1c, 1a+1b)	144(64,3)
2 (2a, 2b, 2c, 2a+2c)	5(2,2)
3 (3a)	55(24,6)
4 (4a, 4b, 4c, 4a+4c+4d, 4c+4d)	18(8,0)
Outros (1a+3a, 1b+2b, 1b+3a, 1b+4, 1b+5)	2(0,9)
Total	224



Os doentes foram anteriormente submetidos a terapêutica com IFN- α peguilado (2a ou 2b) e RBV de acordo com as Linhas de Orientação. No tratamento dos dados foram comparados os vários tipos de resposta (Não-respondedores (NR), Recidivas (RR) e Respondedores (RS)).

Consideram-se doentes não-respondedores os que apresentam virémia detetável no final do tratamento. Nos doentes que recidivam a virémia é indetetável no final do tratamento mas detetável após 6 meses. Os doentes que apresentam uma resposta viral sustentada com virémia indetetável no final do tratamento e nos 6 meses seguintes, são considerados Respondedores.

Tabela 5 – Frequência do tipo de Resposta à Terapêutica antiviral na população HCC estudada (N=159).

TIPO DE RESPOSTA À TERAPÊUTICA	N(%)
Não Respondedores (NR)	34 (21,4)
Recidivas (RR)	24 (15,1)
Respondedores (RS)	101 (63,5)
Total	159 (100)

3.2 Critérios de Exclusão

Como fatores de exclusão distinguem-se a presença de outras doenças hepáticas crónicas (Hepatite B, carcinoma hepatocelular), ingestão de álcool (>40g/dia), infeção por VIH e outras doenças metabólicas e autoimunes, sinais de cirrose, diabetes *mellitus* e ingestão de substâncias e/ou medicamentos que afetam o metabolismo dos lípidos e do ferro.



3.3 Extração de DNA genómico

O sangue periférico é colhido em tubos com EDTA e armazenado a -20°C até se proceder à extração de DNA. A partir do sangue total colhido é extraído DNA genómico e plasma, utilizando um protocolo de extração de DNA realizado pelo método de salting-out adaptado do método de Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. (1991) (Nucleic Acids Res 19(19): 5444).

3.4 Quantificação do DNA

A quantificação ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e determinação da pureza do DNA genómico (razão entre as absorvências a 260 e 280nm) foram determinadas num espectrofotómetro de espectro completo (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific).

3.5 Polimorfismos estudados

Neste estudo analisaram-se dois polimorfismos genéticos do gene do TGF- β , um na região promotora (-509C>T) em que existe a substituição de uma citosina por uma timina e outro na posição 29/codão 10 (29T>C) em que existe uma transição de uma timina para uma citosina resultando na substituição do aminoácido leucina por prolina.

Tabela 6 - Polimorfismos estudados: -509C>T e 29T>C

NÚMERO RS (DBSNP)	SUBSTITUIÇÃO	LOCALIZAÇÃO NO GENE	ALELOS (SELVAGEM:MUTANTE)	FREQUÊNCIA DO ALELO MUTANTE ^A
rs1800469	-509C > T	Promotor	C:T	0,288
rs1800470	29T > C	Exão 1 (Codão 10)	T:C	Nd

^A Na população CEU do *HapMap Project* - NCBI dbSNP.

Nd - Não determinado



3.5.1. Deteção da variante alélica TGF- β -509C>T

3.5.1.1 Amplificação do DNA genómico

A deteção da variante alélica TGF- β -509C>T é realizada por PCR-RFLP. A amplificação por PCR é feita num termociclador GeneAmp® PCR System 2700, AB Applied Biosystems. As sequências de DNA de interesse são amplificadas conforme as condições descritas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse (TGF- β -509C>T).

SNP	SEQUÊNCIA DO PRIMER	FRAGMENTO DE AMPLIFICAÇÃO
TGF- β -509C>T	<i>Forward</i> 5' - TGA TCC AGA TGC GCT GTG GCT T - 3'	280pb
	<i>Reverse</i> 5' - CTC AGT AAA GGA GAG CAA TTC T - 3'	

Tabela 8 – Condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR do polimorfismo (TGF- β -509C>T).

SNP	CONDIÇÕES DE PCR	COMPONENTES
TGF- β -509C>T	35 ciclos Desnaturação: 94°C, 45s <i>Annealing</i> : 53,8°C, 45s Extensão: 72°C, 60s 1 ciclo Extensão final: 72°C, 5min	DNA: 200ng <i>Primer</i> F: 10pmol <i>Primer</i> R: 10pmol Master Mix: 25 μ L H ₂ O: até volume final de 50 μ L

Os produtos de amplificação são separados por eletroforese (tina de eletroforese BIO-RAD Sub-Cell GT, fonte Biorad PowerPac 300) em gel de agarose a 2% (m/v) (SeaKem® LE Agarose, Lonza) com 10 μ g/mL de brometo de etídio, em tampão TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0), durante 30min a 80V.



3.5.1.2 Genotipagem dos indivíduos

O produto de PCR (10 μ L) é digerido com 10U de enzima de restrição Eco 81I . Este enzima reconhece a sequência C*CTNAGG (alelo C) cortando o fragmento em 54pb e 226pb. No caso do alelo T não há local de restrição e no gel o fragmento de 280pb migra mais lentamente. As condições da restrição e os componentes utilizados estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo do polimorfismo (TGF- β -509C>T) através da técnica de RFLP.

SNP	COMPONENTES (THERMO SCIENTIFIC®)	CONDIÇÕES DA RESTRIÇÃO	GENÓTIPO POSSÍVEL
TGF- β -509C>T	Produto de PCR: 10 μ L Enzima: Eco 81I (10U) Tampão: 2 μ L H ₂ O: 7 μ L	37°C, 16h	CT (280pb + 226pb + 54pb) CC (226pb + 54pb) TT (280pb)

Para detetar as variantes alélicas, os fragmentos de restrição são separados por eletroforese em gel de agarose a 3% (m/v) (SeaKem® LE Agarose, Lonza) em tampão TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0) com 10 μ g/mL de brometo de etídio, durante 60min a 85V (Figura 1). A identificação dos fragmentos de restrição é realizada numa câmara escura através de um transiluminador ultravioleta (UV) (GenoSmart, VWR).

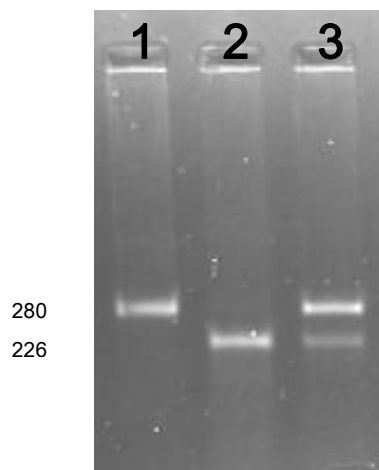


Figura 1: Produtos amplificados por PCR-RFLP para deteção da variante alélica TGF- β -509C>T, visualizados em gel de agarose a 3%. Nos poços 1 a 3 foram aplicados os produtos amplificados: TT, CC e CT, identificados pelos fragmentos 280pb, 226pb e 280pb+226pb, respetivamente.

3.5.2. Deteção da variante alélica TGF- β 29T>C

3.5.2.1 Amplificação do DNA genómico

A deteção da variante alélica TGF- β 29T>C é realizada pelo método de PCR-RFLP, num termociclador GeneAmp® PCR System 2700, AB Applied Biosystems. As sequências de DNA de interesse são amplificadas conforme as condições descritas nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse (TGF- β 29T>C).

SNP	SEQUÊNCIA DO PRIMER	FRAGMENTO DE AMPLIFICAÇÃO
TGF- β 29T>C	<i>Forward</i> 5' - ACC ACA CCA GCC CTG TTC GCG C - 3'	107pb
	<i>Reverse</i> 5' - AGC CAC AGC AGC GGT AGC AGG A - 3'	



Tabela 11 – Condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR (TGF- β 29T>C).

SNP	CONDIÇÕES DE PCR	COMPONENTES
TGF- β 29T>C	35 ciclos Desnaturação: 94°C, 45s <i>Annealing</i> : 67°C, 45s Extensão: 72°C, 60s 1 ciclo Extensão final: 72°C, 5min	DNA: 200ng <i>Primer F</i> : 10pmol <i>Primer R</i> : 10pmol Master Mix: 25 μ L H ₂ O: até volume final de 50 μ l

Os produtos de amplificação são separados por eletroforese (tina de eletroforese BIO-RAD Sub-Cell GT, fonte Biorad PowerPac 300) em gel de agarose a 2% (m/v) (SeaKem® LE Agarose, Lonza) com 1 μ g/mL de brometo de etídio, durante 30min a 80V em tampão TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0).

3.5.2.2 Genotipagem dos indivíduos

O produto de PCR é digerido com 10U de enzima de restrição Mbil, este enzima reconhece a sequência C*CGCTC (alelo C) cortando o fragmento em 23 e 84 pb. No caso do alelo T não há local de restrição e no gel o fragmento migra mais lentamente e tem 107 pb. . As condições da restrição e os componentes utilizados estão descritos na tabela 12.

Tabela 12 - Metodologia usada e fragmentos de restrição possíveis de obter no estudo do polimorfismo (TGF- β 29T>C) através da técnica de RFLP.

SNP	COMPONENTES (THERMO SCIENTIFIC®)	CONDIÇÕES DA RESTRIÇÃO	GENÓTIPO POSSÍVEL
TGF- β 29T>C	Produto de PCR: 10 μ L Enzima: Mbil (10U) Tampão: 2 μ L H ₂ O: 7 μ L	37°C, 16h	TC (107pb + 84pb + 23pb) CC (84pb + 23pb) TT (107pb)

Para detetar as variantes alélicas, os fragmentos de restrição são separados por eletroforese em gel de agarose a 3% (m/v) (SeaKem® LE Agarose, Lonza), com 10 μ g/mL de brometo de etídio, em tampão TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0), durante 60min a 80V (Figura 2). A identificação dos fragmentos de restrição é realizada numa câmara escura através de um transiluminador ultravioleta (UV) (GenoSmart, VWR).

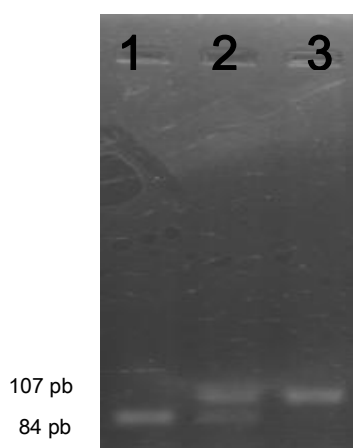


Figura 2: Produtos amplificados por PCR-RFLP para deteção da variante alélica TGF- β 29T>C, visualizados em gel de agarose a 3%. Nos poços 1 a 3 foram aplicados os produtos amplificados: CC, TC e TT, identificados pelos fragmentos 84pb, 107pb+84pb e 107pb, respetivamente.

3.6 Doseamento da concentração plasmática do TGF- β por ELISA

O doseamento da concentração plasmática do TGF- β é feito por ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), R&D Systems. Neste ensaio é utilizada uma microplaca pré-revestida com um anticorpo monoclonal específico para TGF- $\beta 1$ ligado a um enzima. O TGF- $\beta 1$ standard, controlos e amostras são pipetados nos poços e qualquer TGF- $\beta 1$ presente é atraído pelo anticorpo imobilizado. Após lavagem para remoção do anticorpo-enzima não ligado, uma solução substrato é adicionada aos poços permitindo ao enzima desenvolver cor na proporção da quantidade de TGF- $\beta 1$ ligado na etapa inicial. O



desenvolvimento da cor é interrompido com a adição de uma solução STOP e a intensidade da cor é medida.

3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software para Windows Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), sendo o nível de significância estabelecido para $p < 0,05$. A estatística descritiva foi calculada para todas as características demográficas e bioquímicas dos indivíduos do estudo.

Para testar a normalidade da distribuição das variáveis utilizou-se o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov com a correção de Lilliefors para as variáveis com $p > 0,05$.

Para testar a semelhança entre variáveis categóricas discretas, utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson.

Para averiguar a existência de diferenças significativas entre variáveis contínuas normais para cada genótipo, recorreu-se ao teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) e a comparação múltipla de Bonferroni e o T-test.

Para testar se havia diferenças na distribuição dos genótipos para as variáveis contínuas não normais utilizaram-se os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.



4. RESULTADOS

4.1 Genotipagem do TGF- β e identificação dos polimorfismos

Tabela 13 – Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo C>T na posição -509 do promotor do TGF- β na população HCC estudada.

SNP	GENÓTIPO				ALELO	
	CC	CT	TT	CT+TT	Alelo C	Alelo T
TGF-β -509C>T (N=230)	81(35,2)	118(51,3)	31(13,5)	149(64,8)	280 (0,609)	180(0,391)

Genótipo: Valores correspondentes a N (%).

Alelo: valores correspondentes a N (Freq. Alélica).

Tabela 14 – Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β na população HCC estudada.

SNP	GENÓTIPO				ALELO	
	TT	TC	CC	TC+CC	Alelo T	Alelo C
TGF-β 29T>C (N=221)	77(34,8)	119(53,8)	25 (11,3)	144(65,2)	273(0,618)	169(0,382)

Genótipo: Valores correspondentes a N (%).

Alelo: valores correspondentes a N (Freq. Alélica).

A população HCC estudada segue o equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois polimorfismos acima referidos.

4.2 Influência do genótipo do TGF- β nos parâmetros estudados

A avaliação da influência do genótipo nos parâmetros estudados foi feita considerando apenas os níveis basais, isto é, avaliados antes da terapêutica antiviral.



4.2.1. Avaliação da influência do polimorfismo -509C>T nos parâmetros bioquímicos basais

Tabela 15 – Avaliação da influência do polimorfismo C>T na posição -509 do promotor do TGF- β nos parâmetros bioquímicos basais estudados na população HCC.

ESTUDO	PARÂMETRO	TGF-B -509C>T						N	p
		CC		CT		TT			
Carga Viral	VHC-RNA (UI)	75	419107,14 [0-9237492,9]	98	252678,57 [0-7857142,9]	26	1500526,56 [15750-10000000]	199	0,010 **
Enzimas hepáticos	Fosfatase Alcalina ($\mu\text{g/dL}$)	68	67,5 [27-395]	91	66 [39-266]	25	67 [35-133]	184	0,695 **
	AST (UI/L)	76	56 [16-243]	111	46 [19-654]	30	55,5 [24-194]	217	0,153 **
	ALT (UI/L)	77	96 [19-505]	111	75 [15-501]	30	112 [31-430]	218	0,114 **
	Gama GT (UI/L)	76	47,5 [10-492]	110	38,5 [10-1139]	29	51 [10-194]	215	0,124 **
Perfil Lipídico	HDL (mmol/L)	46	1,3 [0,2-3,0]	62	1,25 [0,1-2,6]	19	1,27 [0,3-2,2]	127	0,688 **
	LDL (mmol/L)	43	2,4 [0,5-5,6]	51	2,5 [0,5-5,0]	19	2,6 [0,8-3,9]	113	0,783 **
	Triglicéridos (mmol/L)	72	1,07 [0,4-3,9]	99	1,10 [0,3-4,2]	29	0,96 [0,3-3,5]	200	0,319 **
	Colesterol Total (mmol/L)	72	4,53 [2,3-6,7]	100	4,18 [1,6-7,9]	29	4,25 [2,5-8,8]	201	0,252 **
Metabolismo do ferro	Ferro ($\mu\text{g/dL}$)	48	122,5 [36-254]	67	116 [44-349]	19	129 [38-211]	134	0,828 **
	Transferrina ($\mu\text{g/dL}$)	38	308,74 \pm 62,65	49	304,8 \pm 75,65	14	300,07 \pm 68,65	101	0,919*
	Ferritina (ng/mL)	39	245,0 [21-1388]	63	136 [22-1330]	18	235,5 [93-774]	120	0,025 **
	Ceruloplasmina (mg/dL)	25	34,0 [21-81]	25	35,0 [21-61]	5	31,0 [25-39]	55	0,687 **
	Haptoglobina (mg/dL)	22	93,86 \pm 32,62	28	99,85 \pm 38,25	4	64,5 \pm 25,48	54	0,182*
	Saturação (%)	43	0,38 [0,08-0,83]	64	0,356 [0,16-42]	18	0,469 [0,1-0,82]	125	0,473 **
Níveis de insulina e glucose	Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	37	10,8 [3,0-55,4]	43	10,5 [1,6-81,2]	12	6,95 [2-81]	92	0,362 **
	Glicémia (mg/dL)	52	86,5 [62-123]	66	86,0 [61-288]	17	81,0 [69-101]	135	0,494 **
	HOMA ($\mu\text{U/mL.mg/dL}$)	37	2,53 [0,5-11,7]	43	2,16 [0,3-19,7]	11	1,28 [0,4-7,0]	91	0,141 **
Sobrecarga Oxidante	GSSG (μM)	16	3,82 [1,56-8,46]	31	3,96 [1,41-11,53]	11	3,71 [1,53-5,27]	58	0,680 **
	GSH _{Total} (μM)	16	17,73 [13,85-36,16]	31	19,11 [9,78-49,85]	11	18,08 [7,59-35,96]	58	0,639**
	GSH _{Total} /GSSG	16	5,49 [2,37-10,73]	31	5,23 [2,09-11,32]	11	6,15 [2,05-9,14]	58	0,966 **

Valores correspondentes a N e média \pm desvio-padrão ou mediana [mínimo-máximo].

*Teste Oneway ANOVA

**Teste Mann-Whitney

p<0,05- existem diferenças significativas.



Verificou-se a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para o VHC-RNA e para a Ferritina.

Comparando a média das variáveis não normais pelos genótipos do TGF- β -509C>T agrupados CC (alelo normal) *versus* CT+TT (alelo mutado) verificou-se que $p > 0,05$ logo não existem diferenças significativas.

Comparando a média das variáveis não normais pelos genótipos do TGF- β -509C>T agrupados CC+CT *versus* TT (alelo mutado) verificou-se a existência de diferenças significativas nos valores de VHC-RNA ($p = 0,037$) com valores mais elevados nos homocigóticos mutados TT.

Tabela 16 – Avaliação da influência dos genótipos CC+CT e TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do TGF- β nos valores de RNA e de Ferritina da população HCC.

PARÂMETRO	TGF-B -509C>T					
	CC+CT		TT		N	p
VHC-RNA (UI)	173	289285,71 [0- 9237492,86]	26	1500526,56 [15750- 10000000]	199	0,037

Valores correspondentes a N e mediana [mínimo-máximo].

Aplicou-se o Teste do Chi Quadrado para verificar se há diferenças na distribuição das variáveis discretas (fibrose, esteatose, inflamação e resposta à terapêutica) com o genótipo do TGF-beta -509C>T.

4.2.2. Avaliação da influência do polimorfismo -509C>T nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica

Tabela 17 – Avaliação da influência do polimorfismo C>T na posição -509 do promotor do TGF- β nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica na população HCC.

PARÂMETRO	CLASSIFICAÇÃO	TGF-B -509C>T				p*
		CC	CT	TT	N	
Fibrose (FibroScan)	F 1/2	34 (33,0)	51 (49,5)	18 (17,5)	103	0,387
	F 3/4	17 (43,6)	18 (46,2)	4 (10,3)	39	
	Total	51 (35,9)	69 (48,6)	22 (15,5)	142	
Fibrose Biópsia (Staging)	F 0/2	40 (33,1)	57 (47,1)	24 (19,8)	121	0,013
	F 3/4	20 (54,1)	16 (43,2)	1 (2,7)	37	
	Total	60 (38,0)	73 (46,2)	25 (15,8)	158	
Esteatose	Sem	16 (45,7)	14 (40,0)	5 (14,3)	35	0,500
	Com	32 (34,4)	45 (48,4)	16 (17,2)	93	
	Total	48 (37,5)	59 (46,1)	21 (16,4)	128	
Necro-inflamação (grading)	Ligeira	13 (38,2)	18 (52,9)	3 (8,8)	34	0,392
	Moderada	43 (37,4)	51 (44,3)	21 (18,3)	115	
	Total	56 (37,6)	69 (46,3)	24 (16,1)	149	
Resposta à terapêutica	NR+RR	16 (30,2)	30 (56,6)	7 (13,2)	53	0,522
	RS	35 (36,5)	45 (46,9)	16 (16,7)	96	
	Total	51 (34,2)	75 (50,3)	23 (15,4)	149	

Valores correspondentes a N (%). p* - Teste Chi Quadrado

Verificou-se a existência de diferenças significativas na distribuição dos genótipos com o grau de fibrose (biópsia) ($p=0,013$), existindo um menor número de indivíduos com estadios de fibrose mais graves (3+4) nos portadores da mutação T (CT+TT) ($p=0,035$).

Não se verificaram diferenças significativas na distribuição dos genótipos com o grau de esteatose, inflamação e com a resposta final à terapêutica ($p>0,05$).

Foram feitas as combinações dos genótipos (CC vs CT+TT e CC+CT vs TT) e verificou-se que os resultados se mantêm semelhantes aos dos três genótipos distintos (Tabela 18).



Tabela 18 – Avaliação da influência dos genótipos CC e CT+TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do promotor do TGF- β no grau de fibrose da população HCC.

PARÂMETRO	CLASSIFICAÇÃO	TGF-B -509C>T			
		CC	CT+TT	N	<i>p</i>
Fibrose Biópsia (Staging)	Graus 0-2	40 (33,1)	81 (66,9)	121	0,035
	Graus 3-4	20 (54,1)	17 (45,9)	37	
	Total	60 (38,0)	98 (62,0)	158	

OR(CC)=2,382; IC 95% [1,126-5,040]

Verificou-se um aumento do número de indivíduos com fibroses mais graves (Grau 3-4), portadores do genótipo CC. Estes indivíduos apresentam um risco de 2,382.

Tabela 19 – Avaliação da influência dos genótipos CC+CT e TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do promotor do TGF- β no grau de fibrose da população HCC.

PARÂMETRO	CLASSIFICAÇÃO	TGF-B -509C>T			
		CC+CT	TT	N	<i>p</i>
Fibrose Biópsia (Staging)	Graus 0-2	97 (80,2)	24 (19,8)	121	0,025
	Graus 3-4	36 (97,3)	1 (2,7)	37	
	Total	133 (84,2)	25 (15,8)	158	

OR(CC+CT)=8,907; IC 95% [1,162-68,273]

Ao separar os homozigóticos mutados (TT) obtiveram-se resultados mais significativos ($p=0,025$), verificando-se que estes apresentam graus de fibrose mais leves. Os indivíduos com genótipos CC e CT apresentam um risco de 8,907. Pode-se então concluir que o que representa maior risco não é ser homozigótico CC mas sim ter pelo menos um alelo C.

Foi feito o mesmo estudo para o polimorfismo 29T>C do TGF- β .

4.2.3. Avaliação da influência do polimorfismo 29T>C nos parâmetros bioquímicos basais

Tabela 20 – Avaliação da influência do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β nos parâmetros bioquímicos basais estudados.

ESTUDO	PARÂMETRO	TGF-B 29T>C							
		TT		TC		CC		N	P
Carga Viral	VHC-RNA (UI)	68	271964,29 [607,1-5535714,3]	105	285714,29 [0-8928571,4]	20	404732,14 [11750-10000000]	193	0,457 **
Enzimas hepáticos	Fosfatase Alcalina ($\mu\text{g/dL}$)	63	64 [37-395]	95	68 [35-221]	23	67 [48-133]	181	0,197 **
	AST (UI/L)	75	52 [16-654]	113	48 [16-235]	25	54 [31-265]	213	0,216 **
	ALT (UI/L)	75	87 [22-505]	114	78,5 [15-409]	25	86 [19-430]	214	0,450 **
	Gama GT (UI/L)	73	40 [10-1139]	114	44 [10-581]	25	63 [18-215]	212	0,080 **
Perfil Lipídico	HDL (mmol/L)	44	1,19 [0,3-2,2]	71	1,27 [0,1-3,0]	17	1,33 [0,7-2,1]	132	0,474 **
	LDL (mmol/L)	38	2,45 [0,9-5,0]	61	2,5 [0,5-5,0]	17	2,6 [0,8-3,9]	116	0,523 **
	Triglicéridos (mmol/L)	70	1,07 [0,5-3,9]	102	1,09 [0,3-4,2]	24	1,11 [0,3-3,5]	196	0,859 **
	Colesterol Total (mmol/L)	70	4,25 [2,6-7,1]	103	4,35 [2,3-7,9]	24	4,31 [2,5-8,8]	197	0,738 **
Metabolismo do ferro	Ferro ($\mu\text{g/dL}$)	47	125 [53-279]	65	116 [30-349]	17	116 [38-211]	129	0,684 **
	Transferrina ($\mu\text{g/dL}$)	37	311,70 \pm 78,16	47	297,96 \pm 66,12	13	315,23 \pm 67,13	97	0,592*
	Ferritina (ng/mL)	42	198,5 [36-856]	57	173 [18-1388]	15	303 [55-960]	114	0,277 **
	Ceruloplasmina (mg/dL)	20	33,5 [21-59]	26	38 [23-81]	5	31 [24-39]	51	0,131 **
	Haptoglobina (mg/dL)	19	95,68 \pm 35,81	31	103,38 \pm 37,17	4	57,0 \pm 9,56	54	0,057*
	Saturação (%)	43	0,38 [0,22-1,10]	61	0,37 [0,08-42]	17	0,41 [0,1-0,69]	121	0,673 **
Níveis de insulina e glucose	Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	36	9,65 [1,6-55,4]	43	10,5 [2,8-38,6]	12	8,2 [2-81,2]	91	0,769 **
	Glicémia (mg/dL)	49	83 [66-111]	68	87,5 [61-127]	15	80 [69-115]	132	0,116 **
	HOMA ($\mu\text{U/mL.mg/dL}$)	36	2,01 [0,3-9,2]	43	2,34 [0,5-11,7]	11	1,69 [0,4-19,7]	90	0,514 **

Valores correspondentes a N e média \pm desvio-padrão ou mediana [mínimo-máximo].

*Teste Oneway ANOVA

**Teste Kruskal Wallis

$p < 0,05$ - existem diferenças significativas.



Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos basais entre os diversos genótipos do TGF- β 29T>C ($p > 0,05$).

Comparando a média das variáveis não normais pelos genótipos do TGF- β 29T>C agrupados TT (alelo normal) *versus* TC+CC (alelo mutado) verificou-se que $p > 0,05$ logo não existem diferenças significativas.

Comparando a média das variáveis normais e não normais pelos genótipos do TGF- β 29T>C agrupados TT+TC *versus* CC (alelo mutado) verificou-se a existência de diferenças significativas para os indivíduos homocigóticos mutados (CC), na concentração de Haptoglobina, tendo estes valores mais baixos e para os valores de Gama GT ($p = 0,030$) apresentando valores mais elevados.

Tabela 21 – Avaliação da influência dos genótipos TT+TC e CC, do polimorfismo T>C, na posição 29 do TGF- β na concentração de Haptoglobina e nos valores do enzima hepático Gama GT da população HCC.

PARÂMETRO	TGF-B 29T>C					
	TT+TC		CC		N	p
Haptoglobina (mg/dL)	50	100,46±36,48	4	57,0±9,56	54	0,022
Gama GT (UI/L)	187	42 [10-1139]	25	63 [18-215]	212	0,030

Valores correspondentes a N e média \pm desvio-padrão ou mediana [mínimo-máximo].

Aplicou-se o Teste do Chi Quadrado para verificar se há diferenças na distribuição das variáveis discretas (fibrose, esteatose, inflamação e resposta à terapêutica) com o genótipo do TGF-beta 29T>C. Não se verificaram diferenças significativas entre as variáveis discretas, com o genótipo do TGF-beta 29T>C.



4.2.4. Avaliação da influência do polimorfismo 29T>C nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica

Tabela 22 – Avaliação da influência do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica na população HCC.

PARÂMETRO	CLASSIFICAÇÃO	TGF-B 29T>C				
		TT	TC	CC	N	<i>p</i>
Fibrose (FibroScan)	F 1/2	39 (39,0)	45 (45,0)	16 (16,0)	100	0,249
	F 3/4	13 (33,3)	23 (59,0)	3 (7,7)	39	
	Total	52 (37,4)	68 (48,9)	19 (13,7)	139	
Fibrose Biópsia (Staging)	Graus 0-2	37 (31,9)	61 (52,6)	18 (15,5)	116	0,282
	Graus 3-4	13 (35,1)	22 (59,5)	2 (5,4)	37	
	Total	50 (32,7)	83 (54,2)	20 (13,1)	153	
Esteatose	Sem	13 (38,2)	18 (52,9)	3 (8,8)	34	0,321
	Com	23 (25,8)	52 (58,4)	14 (15,7)	89	
	Total	36 (29,3)	70 (56,1)	17 (13,8)	123	
Necro-inflamação (grading)	Ligeira	10 (30,3)	19 (57,6)	4 (12,1)	33	0,974
	Moderada	36 (32,1)	62 (55,4)	14 (12,5)	112	
	Total	46 (31,7)	81 (55,9)	18 (12,4)	145	
Resposta à terapêutica	NR	12 (38,7)	13 (41,9)	6 (19,4)	31	0,071
	RR	5 (22,7)	17 (77,3)	0 (0)	22	
	RS	34 (37,0)	48 (52,2)	10 (10,9)	92	
	Total	51 (35,2)	78 (53,8)	16 (11,0)	145	

Valores correspondentes a N (%).

Não foram encontradas diferenças significativas nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica entre os diversos genótipos do TGF- β 29T>C ($p > 0,05$).

Foram feitas as combinações dos genótipos e verificou-se que os resultados se mantêm semelhantes aos dos três genótipos distintos.



4.3 Influência da concentração do TGF- β nos parâmetros estudados

Aplicou-se o teste Oneway ANOVA para verificar se a concentração do TGF- β varia com os génotipos do TGF- β -509C>T ou do TGF- β 29T>C e não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos polimorfismos ($p > 0,05$).

Tabela 23-Avaliação da relação da concentração de TGF- β com os génotipos do TGF- β -509C>T e 29T>C.

TGF-B		[TGF-B]		P
		N	Média±Desvio Padrão	
TGF- β -509	CC	28	1222,54±586,43	0,480
	CT	38	1307,84±606,74	
	TT	12	1470,85±554,63	
TGF- β 29	TT	31	1311,95±573,18	0,954
	TC	38	1269,0±579,51	
	CC	9	1305,2±774,55	

Valores correspondentes a N e média \pm desvio-padrão.

Foi aplicado o Independent Samples T Test para verificar se a concentração do TGF- β varia com os génotipos do TGF- β -509C>T (CC vs CT+TT ou CC+CT vs TT) ou do TGF- β 29T>C (TT vs TC+CC ou TT+TC vs CC) agrupados e não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos casos ($p > 0,05$).

Aplicou-se o Independent Samples T Test para verificar se existem diferenças significativas nas variáveis discretas (fibrose, esteatose, inflamação) com a concentração de TGF- β e não se encontraram diferenças significativas ($p > 0,05$). Foi aplicado o teste Oneway ANOVA



para aferir a existência de diferenças significativas na resposta à terapêutica com a concentração de TGF- β e não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 24- Avaliação da relação da concentração de TGF- β com as variáveis discretas (fibrose, esteatose, inflamação e resposta à terapêutica).

TGF-B		N	MÉDIA±DESVIO-PADRÃO	P
Fibrose (Fibroscan)	1+2	50	1318,78±566,85	0,170*
	3+4	18	1098,93±604,95	
Fibrose Biópsia (Staging)	0+1+2	39	1307,95±584,71	0,479*
	3+4	13	1172,18± 622,39	
Esteatose	Sem	11	1194,73± 615,54	0,419*
	Com	32	1363,83± 584,93	
Grau de Esteatose	1+2	24	1446,07± 592,90	0,172*
	3+4	8	1117,13± 517,13	
Inflamação	Ligeira	9	1132,17± 550,47	0,366*
	Moderada	41	1330,38± 598,23	
Resposta à terapêutica	NR	11	1363,63± 642,14	0,704**
	RR	6	1211,46± 447,35	
	RS	30	567,49± 103,61	

*T-Test **Oneway ANOVA

Valores correspondentes a N e média \pm desvio-padrão.

Aplicou-se o teste de correlação de Spearman para avaliar a correlação da concentração de TGF- β com as variáveis contínuas não normais (VHC-RNA, Fosfatase alcalina, AST, ALT, Gama GT, Ferro, Saturação, Ferritina, Colesterol, Triglicéridos, HDL, LDL, Glicémia, Insulina, HOMA, Ceruloplasmina, GSH_{Total}, GSSG e GSH_{Total}/GSSG) e verificou-se que não existe correlação significativa ($p > 0,05$).



Utilizou-se o teste de correlação de Pearson para avaliar a correlação da concentração de TGF- β com as variáveis contínuas normais (Haptoglobina, Transferrina) e concluiu-se que também não existe correlação significativa ($p > 0,05$).

4.4 Influência da terapêutica nas variáveis discretas (fibrose, esteatose e inflamação) em indivíduos com resposta sustentada

Selecionaram-se os indivíduos que responderam à terapêutica, aplicou-se o Teste Chi-Quadrado e verificou-se a existência de diferenças significativas na fibrose (fibroscan) ($p = 0,005$) com um aumento de indivíduos com estadios de fibrose mais baixos (F1/2) depois do tratamento (Tabela 25).

Tabela 25- Fibrose (Fibroscan) antes e depois da terapêutica em indivíduos RS

		FIBROSE (FIBROSCAN) DEPOIS		TOTAL
		F1/2 (<5,4 + 5,4-8,1)	F3/4 (8,2-10 + $\geq 10,1$)	
FIBROSE (FIBROSCAN) ANTES	F1/2 (<5,4 + 5,4-8,1)	32(97%)	1(3%)	33(100%)
	F3/4 (8,2-10 + $\geq 10,1$)	5(55,6%)	4(44,4%)	9(100%)
Total		37(88,1%)	5(11,9%)	42(100%)

Valores correspondentes a N (%).

Aplicou-se o Teste Chi Quadrado para verificar a existência de uma relação entre as diferenças significativas encontradas na fibrose antes e depois do tratamento e os polimorfismos do TGF- β -509C>T e 29T>C. Ao dividir os indivíduos respondedores pelos diferentes genótipos dos dois polimorfismos estudados foi analisada a fibrose antes e depois



da terapêutica. Apenas foram encontradas diferenças significativas ($p=0,01$) para os portadores do alelo normal do TGF- β 29T>C (TT+TC), com um aumento do número de indivíduos com estadios de fibrose mais baixos (F1/2) depois da terapêutica (Tabela 26).

Tabela 26- Avaliação da influência do polimorfismo T>C na posição 29 do TGF- β na fibrose, antes e depois da terapêutica, na população HCC.

		FIBROSE (FIBROSCAN) DEPOIS		TOTAL
		F1/2 (<5,4 + 5,4-8,1)	F3/4 (8,2-10 + $\geq 10,1$)	
FIBROSE (FIBROSCAN) ANTES	F1/2 (<5,4 + 5,4-8,1)	24(96%)	1(4%)	25(100%)
	F3/4 (8,2-10 + $\geq 10,1$)	4(50%)	4(50%)	8(100%)
Total		28(84,8%)	5(15,2%)	33(100%)

Valores correspondentes a N (%).



4.5 Influência da terapêutica nas variáveis contínuas em indivíduos com resposta sustentada

Tabela 27- Avaliação da influência da terapêutica nas variáveis contínuas em indivíduos com resposta sustentada

		RS		N	P
		Antes da terapêutica	Depois da terapêutica		
Metabolismo do Ferro	Ferro ($\mu\text{g/dL}$)	106 [40-288]	112 [41-233]	36	0,768
	Saturação (%)	0,34 [0,10-1,10]	0,36 [0,13-0,81]	34	0,215
	Ferritina (ng/mL)	144 [40-1249]	91 [15-844]	27	0,033
	Ceruloplasmina (mg/dL)	39 [24-61]	35 [29-60]	9	0,943
	Transferrina ($\mu\text{g/dL}$)	290,3 \pm 80,4	314,7 \pm 80,4	27	0,088
	Haptoglobina (mg/dL)	95,3 \pm 33,9	93,1 \pm 35,0	9	0,728
Perfil Lipídico	Colesterol (mmol/L)	4,3 [1,6-7,9]	4,8 [1,9-7,1]	81	0,000
	Triglicéridos (mmol/L)	1,1 [0,5-4,2]	1,3 [0,5-5,4]	80	0,024
	HDL (mmol/L)	1,2 [0,2-2,6]	1,2 [0,2-2,4]	42	0,507
	LDL (mmol/L)	2,4 [0,5-4,4]	2,9 [0,6-4,7]	33	0,006
Níveis de Insulina e Glucose	Glicémia (mg/dL)	83 [61-116]	90 [52-110]	44	0,027
	Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	10 [2-81]	7,8 [0,7-7,8]	27	0,869
	HOMA ($\mu\text{U/mL.mg/dL}$)	2,0 [0,4-5,9]	1,7 [0,2-8,5]	26	0,684
Sobrecarga Oxidante	GSH _{Total} (μM)	16,1 [15,7-16,5]	29,2 [26,4-32,0]	2	0,180
	GSSG (μM)	4,2 [3,4-5,0]	3,3 [3,0-3,6]	2	0,655
	GSH _{Total} /GSSG	4,0 [3,1-4,9]	8,7 [8,6-8,8]	2	0,180
Carga Viral	VHC-RNA (UI)	192857 [0-10000000]	0 [0-5892857]	73	0,000
Enzimas Hepáticos	AST (UI/L)	49 [19-235]	21 [9-48]	95	0,000
	ALT (UI/L)	80 [19-430]	19 [7-87]	97	0,000
	Gama GT (UI/L)	39 [11-326]	22 [5-102]	97	0,000
	Fosfatase Alcalina ($\mu\text{g/dL}$)	62 [27-154]	61 [31-110]	73	0,160

N e mediana [mínimo-máximo] ou média \pm desvio-padrão. **p<0,05-** existem diferenças significativas.



Foram encontradas diferenças significativas na ferritina, colesterol, triglicéridos, LDL, glicémia, VHC-RNA, AST, ALT e Gama GT ($p < 0,05$).

Em indivíduos com resposta sustentada (RS) à terapêutica foi estudada a variação dos parâmetros bioquímicos acima descritos, antes e depois da terapêutica, para os diferentes genótipos do TGF- β -509C>T e 29T>C.

Tabela 28- Avaliação da influência dos genótipos CC, CT e TT, do polimorfismo C>T, na posição -509 do promotor do TGF- β , nos parâmetros bioquímicos basais estudados, em indivíduos com resposta sustentada, antes e depois da terapêutica.

		RS		N	P
		Antes da terapêutica	Depois da terapêutica		
TGF- β -509 CC+CT	Colesterol (mmol/L)	4,2 [1,6-7,9]	4,7 [2,6-7,1]	62	0,000
	Ferritina (ng/mL)	120 [40-1249]	81 [15-375]	21	0,014

N e mediana [mínimo-máximo] ou média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$ - existem diferenças significativas.

Tendo em conta o polimorfismo TGF- β -509C>T, foi possível verificar que a ferritina diminuiu e que o colesterol aumenta significativamente, depois do tratamento, apenas nos indivíduos CC e CT.

Tabela 29- Avaliação da influência dos genótipos TT, TC e CC, do polimorfismo T>C, na posição 29 do TGF- β , nos parâmetros bioquímicos basais estudados, em indivíduos com resposta sustentada, antes e depois da terapêutica.

		RS		N	P
		Antes da terapêutica	Depois da terapêutica		
TGF- β 29 TT+TC	Colesterol (mmol/L)	4,3 [2,3-7,9]	5,2 [2,5-7,1]	66	0,000

N e mediana [mínimo-máximo] ou média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$ - existem diferenças significativas.

Tendo em conta o polimorfismo TGF- β 29T>C, foi possível verificar que o colesterol aumenta significativamente, depois do tratamento, apenas nos indivíduos TT e TC.



4.6 Influência dos parâmetros estudados na resposta à terapêutica antiviral

Tabela 30- Avaliação da influência dos parâmetros bioquímicos basais estudados (VHC-RNA e Gama GT) na resposta à terapêutica.

	RS		NR		P
	N	MEDIANA [MIN-MAX]	N	MEDIANA [MIN-MAX]	
VHC-RNA (UI)	87	189285 [336,8–10000000]	30	437500 [12142-9497142]	0,035
Gama GT (UI/L)	96	39 [12-326]	31	63 [17-536]	0,006

RS-Resposta sustentada

NR-Não-respondedores

p<0,05- existem diferenças significativas.

Verificou-se uma diminuição significativa da carga viral nos indivíduos respondedores ($p=0,035$) assim como da Gama GT ($p=0,006$). Estes resultados mantêm-se quando os indivíduos são separados pelos diferentes genótipos dos dois polimorfismos estudados.



5. DISCUSSÃO

A hepatite relacionada com o VHC é uma doença progressiva que pode resultar em hepatite crónica, cirrose e carcinoma hepatocelular. Representa um problema global de saúde uma vez que não existe vacina disponível atualmente, além disso, a falência hepática devida à HCC é uma das razões mais comuns para o transplante hepático.²

5.1 Genotipagem do TGF- β e identificação dos polimorfismos

As frequências obtidas na população em estudo para o polimorfismo -509C>T foram de 35,2% para CC, 51,3% para CT, 13,5% para TT e 64,8% juntando os genótipos com pelo menos um alelo mutado (CT+TT). Ao comparar os resultados obtidos com os observados na população caucasiana (CEU) do HapMap Project verificou-se que nesta população há uma maior frequência de genótipo CC (53,1%) enquanto na nossa população o genótipo CT está em maioria, quanto ao genótipo TT a frequência é semelhante (10,6%). Relativamente à frequência do alelo T na população caucasiana (CEU) do HapMap Project (28,8%) é inferior à obtida neste estudo (39,1%).⁴⁷

As frequências obtidas para o polimorfismo 29T>C foram de 34,8% para TT, 53,8% para TC, 11,3% para CC e 64,8% juntando os genótipos com pelo menos um alelo mutado (TC+CC). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Wang et al., numa população Caucasiana com HCC (40,8% TT, 48,8% TC e 10,4% CC). Estão também de acordo com os estudos de Zein et al. numa população VHC Caucasiana (32,3% TT, 54,8% TC e 12,9% CC).^{41,45}



5.2 Influência do genótipo do TGF- β nos parâmetros estudados

Um dos objetivos deste trabalho foi determinar se os polimorfismos estudados do TGF- β influenciam os parâmetros bioquímicos basais (carga viral, enzimas hepáticas, perfil lipídico, parâmetros do metabolismo do ferro, níveis de insulina e glucose e sobrecarga oxidante), as características fisiopatológicas (Fibrose hepática, avaliada por FibroScan e Biópsia, Esteatose, Necro-inflamação (*grading*)) e a resposta à terapêutica da HCC.

Os resultados demonstram que existem diferenças significativas para alguns parâmetros basais estudados, no polimorfismo -509C>T do TGF- β . Os portadores do alelo mutante (TT) na posição -509 apresentam níveis de VHC-RNA mais elevados e uma tendência para níveis de Ferritina mais elevados (Tabela 16). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Kimura et al. que concluiu que o alelo -509C está associado a uma maior taxa de eliminação do VHC. Pode-se assim concluir que o alelo mutante (TT) se associa a uma menor taxa de eliminação do VHC, apresentando o alelo C, com menor atividade transcricional, uma maior taxa de eliminação viral. Uma vez que os indivíduos com genótipos CC e CT possuem menor carga viral, pode-se concluir que terão menor inflamação.⁴⁴

Ao comparar a média das variáveis normais e não normais pelos genótipos do TGF- β 29T>C agrupados TT+TC versus CC (alelo mutado), verificou-se a existência de diferenças significativas para a concentração de Haptoglobina ($p=0,022$) em que os indivíduos homocigóticos mutados (CC) têm valores mais baixos e nos valores de Gama GT ($p=0,030$) valores mais elevados.

Shun-Jiang et al. encontrou resultados concordantes com os obtidos neste estudo relativamente ao facto de a variante alélica C do polimorfismo 29T>C apresentar valores de



Haptoglobina mais baixos. Foi demonstrado que o TGF-beta modula a expressão genética de proteínas de fase aguda e, conseqüentemente a reação de fase aguda em hepatócitos e células epiteliais do intestino. Mais especificamente, esta citocina atenua indiretamente a expressão da haptoglobina através da diminuição da quantidade de uma classe importante de fatores de transcrição envolvidos na regulação da resposta inflamatória. Deste modo, qualquer variante polimórfica do gene do TGF beta que esteja associada a níveis plasmáticos mais elevados desta citocina poderá também estar associada a uma diminuição da concentração sérica de haptoglobina. De facto, os resultados mostram que a variante alélica C do polimorfismo 29T>C apresenta valores de haptoglobina sérica mais baixos. ⁴⁸

Em relação à influência do polimorfismo -509C>T do TGF- β nas características fisiopatológicas e resposta à terapêutica na população HCC os resultados demonstram a existência de diferenças significativas na distribuição dos genótipos com o grau de fibrose (biópsia) ($p=0,013$), verificando-se um menor número de indivíduos com estadios de fibrose mais graves (3+4) nos portadores da mutação T (CT+TT) ($p=0,035$).

Tache et al. refere que um dos efeitos biológicos do TGF- β é a inibição da atividade das metaloproteinases da matriz e o aumento da atividade dos seus inibidores tecidulares provocando assim um desequilíbrio na homeostase da matriz extracelular e um aumento do grau de fibrose. A relação do aumento dos níveis de fibrose com o alelo associado a uma maior transcrição do gene não se verificou neste estudo. Como está demonstrado, os polimorfismos do TGF- β , podem afetar a sua concentração plasmática, o que também não se verificou no nosso estudo. Seria de esperar que níveis de fibrose mais elevados estivessem relacionados com o alelo associado a maior concentração de TGF- β (TGF- β



-509C>T, alelo T). Não foram encontrados artigos que relacionem o grau de fibrose com este polimorfismo.^{38,42,43,45}

No polimorfismo 29T>C não foram encontradas diferenças significativas relativamente às características fisiopatológicas e resposta à terapêutica, no entanto em outros estudos verificou-se um elevado risco para níveis de fibrose mais elevados quando uma prolina está presente no codão 10 (alelo C). Gewaltig et al. verificou que a taxa de progressão de fibrose nos pacientes com genótipos TC e CC era quase três vezes mais rápida que nos pacientes com genótipo TT.^{41, 46}

Relativamente à influência da concentração do TGF- β nos parâmetros estudados, neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros estudados. Radwan et al. verificou um aumento significativo da concentração do TGF- β para o genótipo -509TT. Kanzler et al. relatou a existência de uma correlação entre os níveis séricos de TGF- β e os níveis de progressão de fibrose.^{49, 50}

5.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e características fisiopatológicas, antes e depois da terapêutica antiviral, em indivíduos com resposta sustentada.

Na determinação da existência de diferenças significativas entre os parâmetros bioquímicos, em indivíduos com resposta sustentada estas foram encontradas, na ferritina, colesterol, triglicéridos, LDL, glicémia, VHC-RNA, AST, ALT e Gama GT ($p < 0,05$). Verificou-se um aumento do colesterol para ambos os polimorfismos. No polimorfismo -509C>T, em indivíduos CC e CT e no polimorfismo 29T>C, em indivíduos TT e TC, depois da terapêutica.



Foi observado em outros estudos uma concentração plasmática de colesterol mais baixa em pacientes com Hepatite C e uma supressão da sua síntese. A síntese de colesterol pode ser diminuída pela reduzida função hepática ou pelo VHC. O VHC pode interromper a síntese de colesterol ao desviar o intermediário geranilpirofosfato que parece ser necessário à replicação viral. Pacientes com VHC têm níveis de colesterol plasmático mais baixos. Jang et al. verificou níveis de colesterol significativamente aumentados 24 semanas após o fim da terapêutica entre os indivíduos com resposta viral sustentada após terapêutica antiviral para HCC. ^{52,53,54}

Encontrou-se também uma diminuição da ferritina, para o polimorfismo -509C>T em indivíduos CC e CT. Chiou et al. encontrou uma correlação positiva entre os níveis de ferritina e a inflamação do fígado durante o tratamento ($p < 0,01$). Verificou níveis de ferritina mais baixos nos pacientes com resposta viral sustentada, na 4^a semana pós-terapia ($p < 0,01$). ⁵⁵

Na determinação da existência de diferenças significativas entre as características fisiopatológicas em indivíduos com resposta sustentada foram encontradas diferenças significativas na fibrose (fibroscan) ($p = 0,005$) com um aumento de indivíduos com estádios de fibrose mais baixos (F1/2) depois do tratamento.

Apenas foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,01$) para os portadores do alelo normal do TGF- β 29T>C (TT+TC), com um aumento do número de indivíduos com estádios de fibrose mais baixos (F1/2) depois da terapêutica. Gewaltig et al. e Wang et al. concluíram nos seus estudos que os pacientes com pelo menos uma prolina no codão 10 (alelo C, 29T>C) têm um risco maior de apresentar graus de fibrose mais pronunciada, estando associados a uma progressão mais rápida da fibrose. ^{41, 46}



Outros estudos mostram que o colesterol pode estar aumentado devido à fibrose, o que se verifica também neste estudo relativamente ao polimorfismo 29T>C. Verificou-se um aumento significativo do colesterol, depois do tratamento, em indivíduos TT e TC. Jang et al. concluiu no seu estudo que os níveis de colesterol estavam aumentados no grupo de pacientes com resposta viral sustentada, após terapêutica antiviral para a HCC. Esta alteração pode ser devida ao aumento da fibrose hepática secundária à eliminação do vírus, ao invés da erradicação do vírus por si só.⁵⁴

Os níveis séricos de colesterol total representam valor total de colesterol, endogenamente sintetizado e exogenamente absorvido, que é transportado para o sangue através da ligação às lipoproteínas, incluindo lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e apolipoproteínas. O colesterol endógeno é sintetizado nos hepatócitos pela via do mevalonato. Por outro lado, colesterol exógeno é absorvido por endocitose, sob forma de LDL, nos hepatócitos e hidrolisado para colesterol livre e ácidos gordos. Uma vez que a maioria destes processos metabólicos dos lípidos ocorre no fígado, os níveis séricos de colesterol total estão intimamente relacionados com a gravidade das doenças de fígado.⁵⁴

Kimball et al. demonstrou que os indivíduos respondedores à terapêutica produzem mais TGF- β ($p=0,06$) que os não-respondedores. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas na resposta à terapêutica com a concentração de TGF- β . Tsushima et al. verificou que o TGF- β estava significativamente diminuído em indivíduos com resposta sustentada no final da terapêutica ($p<0,05$).^{56,57}



5.4 Influência dos parâmetros estudados na resposta à terapêutica antiviral

Outro dos objetivos deste trabalho foi determinar se os parâmetros estudados influenciam a resposta à terapêutica antiviral. Foram encontradas diferenças significativas na carga viral ($p=0,035$) e no Gama GT ($p=0.006$), ambos com diminuição significativa em indivíduos com resposta sustentada. A diminuição da carga viral é um resultado espectável de uma resposta sustentada à terapêutica. Uyanikoglu et al. refere que em terapêutica standard com Interferão ou combinada Interferão/Ribavirina, o VHC-RNA estava negativo em 92% a 100% dos pacientes durante 1 a 12 anos após resposta viral sustentada, em pacientes com hepatite C crónica. Calleja-Panero et al. relata que pacientes com anticorpos para o VHC positivos apresentam também valores de Gama GT significativamente mais elevados. O Gama GT é um marcador da lesão do fígado, uma vez que, neste estudo, há uma diminuição significativa da carga viral do VHC, após a terapêutica, seria de esperar também a diminuição deste enzima. Galán et al. indica valores de Gama GT mais elevados em pacientes que não atingiram resposta viral sustentada, refletindo uma progressão da doença hepática aumentada entre os pacientes que não responderam à terapêutica. Iwata et al. encontrou no seu estudo níveis de Gama GT significativamente mais baixos em indivíduos com resposta viral sustentada. ^{58,59,60,61,62}



6. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo realizado sustentam a hipótese de que o TGF-beta tem um papel importante na Hepatite C Crónica uma vez que os seus polimorfismos se relacionam, entre outros, com fatores de bom prognóstico para esta patologia. Também parecem estar envolvidos numa melhoria da fibrose hepática após terapêutica antiviral e podem desempenhar um papel indireto relevante no tipo de resposta a esta terapêutica uma vez que modulam fatores bioquímicos clínicos do hospedeiro que se relacionam com uma resposta sustentada ao tratamento, nomeadamente a carga viral, gama GT, colesterol e ferritina.

O estudo realizado poderá contribuir para um conhecimento mais aprofundado e sustentado do papel de determinadas citocinas na história natural da Hepatite C Crónica, nomeadamente, dos seus polimorfismos genéticos, possibilitando definir riscos individuais para uma maior progressão da doença e para um maior risco de falha da terapêutica antiviral standard. Poderá ainda representar um papel relevante na busca de novas estratégias terapêuticas adaptadas ao indivíduo tendo em conta o seu background genético e contribuindo, deste modo, para uma maior taxa de sucesso no tratamento e no prognóstico desta patologia.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Hepatitis C. WHO Media Centre. July 2012 (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html)
2. Seeff Leonard B..Natural History of Hepatitis C.Hepatology September 1997, Vol.26, No.3, Suppl.1
3. Richardson MM., Powell EE., Barrie HD., Clouston AD., Purdie DM., Jonsson JR.. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. Journal of Medical Genetics. 2005; 42:e45
4. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease.Trends Microbiol.2004 Feb;12(2):96-102
5. Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. J Hepatol.2000;32(1 Suppl):98-112
6. Montaña-Loza A, Meza-Junco J, Remes-Troche JM.. Pathogenesis of hepatitis C virus infection. Rev Invest Clin.2001 Nov-Dec; 53(6):561-8
7. Ambrosch A, König W. Characteristics of the hepatitis C virus and viral predictors of therapeutic response. Med Klin (Munich).1999 Nov 15;94(11):626-32
8. Moradpour D, Blum HE.Current and evolving therapies for hepatitis C. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Nov;11(11):1199-202
9. Alexopoulou A, Papatheodoridis GV. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C.World J Gastroenterol 2012; 18(42):6060-6069
10. Romani S. et al. Investigation of Transforming Growth Factor- β 1 Gene Polymorphisms Among Iranian Patients With Chronic Hepatitis C. Hepatitis Monthly 2011;11(11):901-906
11. Aman et al. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C.Virology Journal 2012; 9:57
12. Munir S. et al. Hepatitis C Treatment: current and future perspectives. Virology Journal 2010; 7:296
13. Asselah T. et al. Gene expression and hepatitis C virus infection. Gut 2009; 58:846-858
14. Zein N. The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. Cleveland Clinic Journal of Medicine 2003; Vol 70 Sup 4
15. Lin W. et al. HCV regulates TGF- β 1 production through the generation of reactive oxygen species in an NF κ B-dependent manner. Gastroenterology. 2010 June; 138(7):2509-2518



16. Nagaraja T., Chen L., Balasubramanian A., Groopman JE., Ghoshal K., et al. (2012) Activation of the Connective Tissue Growth Factor (CTGF)-Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) Axis in Hepatitis C Virus-Expressing Hepatocytes. PLOS ONE 7(10): e46526. doi:10.1371/journal.pone.0046526
17. Araujo E., Cavalheiro N., Leitão R., Tosta R., Barone A.. Hepatitis C viral load does not predict disease outcome: going beyond numbers. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 44(2):71-78, 2002
18. Alexopoulou A., Papatheodoridis GV. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C. World J Gastroenterol 2012; 18(42): 6060-6069
19. Vere CC, Streba L, Rogoveanu I. Statins in the Treatment of Hepatitis C. Hepat Mon. 2012;12(6):369-71
20. Klenerman P., Gupta PK.. Hepatitis C virus: current concepts and future challenges. QJ Med 2012, 105:29-32
21. Presser L., Haskett A., Waris G.. Hepatitis C virus-induced furin and thrombospondin-1 activate TGF- $\beta 1$: Role of TGF- $\beta 1$ in HCV replication. Virology. 2011 April 10; 412(2):284-296
22. El Bassiouny AEI, Zoheiry MMK, Nosseir MMF, El-Ahwany EG, El-Bassiouni NEI. Expression of cyclooxygenase-2 and transforming growth factor-beta1 in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. MedGenMed. 2007;9(3):45.
23. Valva P., Casciato P., Diaz Carrasco JM., Gadano A., Galdame O., et al.. The Role of Serum Biomarkers in Predicting Fibrosis Progression in Pediatric and Adult Hepatitis C Virus Chronic Infection. 2011 August. PLoS ONE 6(8):e23218
24. Del Campo JA., Rojas A., Romero-Gómez M.. Entry of hepatitis C virus into the cell: A therapeutic target. World J Gastroenterol 2012; 18(33):4481-4485
25. Deveci O. et al.. Prognostic significance of transforming growth factor-beta-1 in chronic hepatitis C virus infection. African Journal of Microbiology Research. 2012 May 16; Vol. 6(18): 4013-4016
26. Liang TJ., Rehermann B., Seeff LB., Hoofnagle JH.. Pathogenesis, Natural History, Treatment, and Prevention of Hepatitis C. Annals of Internal Medicine. 2000; Vol. 132; No4:296-305
27. Martins T., Narciso-Schiavon J., Schiavon L.. Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection. Revista da Associação Médica Brasileira 2011; 57(1):105-110
28. Dennler S. et al. Transforming growth factor β signal transduction. Journal of Leukocyte Biology. 2002 May; Vol 71: 731-740



29. McCartney-Francis N., Wahl S.. Transforming growth factor β : a matter of life and death. *Journal of Leukocyte Biology*. 1994 March; Vol 55:401-409
30. Eurich D. et al.. Transforming Growth Factor- β 1 polymorphisms and progression of graft fibrosis after liver transplantation for hepatitis C virus-Induced liver disease. *Liver Transplantation*, 2011 March, 17:279-299
31. Schuppan D. et al. Hepatitis C and liver fibrosis. Review. *Cell Death and Differentiation*. (2003) 10; S59-S67
32. U.S. National Library of Medicine. TGF- β 1, Genetics Home Reference. April 2008 (<http://ghr.nlm.nih.gov/>)
33. Bissell DM. Chronic liver injury, TGF- β , and cancer. *Experimental and Molecular Medicine*, 2001 December, Vol.33, No.4, 179-190
34. Bataller R., Brenner D.. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005 Feb; Vol 115:209-218
35. Marcellin P., Asselah T., Boyer N.. Fibrosis and Disease Progression in Hepatitis C. *Hepatology*, November 2002, Vol.36, No.5, Suppl.1
36. Janczewska-Kazek E. et al. Influence of antiviral treatment on Transforming Growth Factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C. *E&C Hepatology*, 2005; 1(2):89-92
37. Hold G., Untiveros P., Saunders K., El-Omar E.. Role of host genetics in fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2009, 2:6
38. Tache D. et al. Evidence for the involvement of TGF- β 1-CTGF axis in liver fibrogenesis secondary to hepatic viral infection. *Rom J Morphol Embryol* 2011, 52(1 Suppl):409-412
39. Weng H. et al. The etiology of liver damage imparts cytokines Transforming Growth Factor- β 1 or Interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology*, 2009, Vol.50, No. 1
40. Elgendy S. et al. A Panel of Molecular Markers in Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.*, December 2005, Vol.17, No.4, 270-278
41. Wang H., Mengsteab S. et al.. Transforming Growth Factor- β 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11(13):1929-1936
42. Barrett, S., Collins, M., Kenny, C., Ryan, E., Keane, C.O. and Crowe, J. (2003), Polymorphisms in tumour necrosis factor- α , transforming growth factor- β , interleukin-



- 10, interleukin-6, interferon- γ , and outcome of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.*, 71: 212–218
43. Salam M. et al. Transforming Growth Factor- $\beta 1$ C-509T polymorphism, oxidant stress, and early-onset childhood asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; vol.176:pp. 1192-1199
44. Kimura T. et al. Association of Transforming Growth Factor- $\beta 1$ functional polymorphisms with natural clearance of Hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; vol.193:pp.1371-4
45. Zein N., Germer J., El-Zayadi A., Vidigal P. Ethnic differences in polymorphisms of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-10, and Transforming Growth Factor- $\beta 1$ genes in patients with chronic Hepatitis C virus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; vol.70, Issue 4:pp.434-437
46. Gewaltig J. et al. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta*, February 2002, vol. 316, Issues 1–2, pp. 83-94
47. National Center for Biotechnology Information, The Single Nucleotide Polymorphism database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)
48. Shun-Jiang Yu, Nathalie Rivard, and Claude Asselin. Attenuation of Haptoglobin Gene Expression by TGF β Requires the MAP Kinase Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, June 1999, vol.259, Issue 3, pp.544 -549
49. Radwan M. et al. Influence of transforming growth factor- $\beta 1$ and tumor necrosis factor- α genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine*, October 2012, vol. 60, Issue 1, pp.271-276
50. Kanzler S. et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *Journal of Viral Hepatitis*, vol.8, Issue 6: pp.430-437
51. Dai CY. et al. Association between transforming growth factor-beta 1 polymorphism and virologic characteristics of chronic hepatitis C. *Translational Research*, October 2008, vol.152, Issue 4:pp.151-156
52. Corey KE. et al. Hepatitis C virus infection and its clearance alter circulating lipids: implications for long-term follow-up. *Hepatology*. October 2009;vol.50, Issue 4:pp.1030-7



53. Lambert JE. et al. Elevated lipogenesis and diminished cholesterol synthesis in patients with Hepatitis C viral infection compared to healthy humans. *Hepatology*. May 2013; vol.57, Issue 5:pp.1697-704
54. Jang et al. The Effect of Antiviral Therapy on Serum Cholesterol Levels in Chronic Hepatitis C. *Gut and Liver*, September 2011, Vol. 5, No. 3, pp. 356-362
55. Chiou YL. et al. The effect of increased oxidative stress and ferritin in reducing the effectiveness of therapy in chronic hepatitis C patients. *Clinical Biochemistry*. November 2012; vol.45, Issues 16-17:pp.1389-93
56. Kimball P. et al. Ethnicity and cytokine production gauge response of patients with hepatitis C to interferon-alpha therapy. *J Med Virol*. November 2001; vol.65, Issue 3:pp.510-6
57. Tsushima H. et al. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. *Journal of Hepatology*, January 1999, vol.30, Issue 1:pp.1-7
58. Uyanikoglu A. et al. Durability of Sustained Virologic Response in Chronic Hepatitis C. *Gut and Liver*, July 2013, vol. 7, No. 4, pp. 458-461
59. Calleja-Panero et al. Prevalence of viral hepatitis (B and C) serological markers in healthy working population. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2013, vol. 105. No. 5, pp. 249-254
60. Whitfield J. B. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2013, vol.38, No.4:pp.263-355
61. Galán R. et al. Antiviral Regimen Complexity Index as an Independent Predictor of Sustained Virologic Response in Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Managed Care Pharmacy*, July/August 2013, vol.19, No.6, pp.448-453
62. Iwata et al. The Role of Bile Acid Retention and a Common Polymorphism in the ABCB11 Gene as Host Factors Affecting Antiviral Treatment Response in Chronic Hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* 2011, vol.18, No.11, pp.768-778