MÁRCIA SALDANHA KUBRUSLY

**Identificação de genes diferencialmente expressos na
cirrose secundária à esteatohepatite não alcoólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientação: Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kubrusly, Márcia Saldanha

Identificação de genes diferencialmente expressos na cirrose secundária à
esteatohepatite não alcoólica / Márcia Saldanha Kubrusly. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Marcel Cerqueira Cesar Machado.

Descritores: 1.Cirrose 2.Esteatohepatite 3.Expressão gênica 4.Imunoistoquímica

USP/FM/SBD-447/08

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais Antonio (in memoriam) e Yvone
pelo amor e carinho incondicionais, dedicação e incentivo...*

*As minhas adoradas irmãs Violêta e Flávia
pelo amor, carinho e amizade sempre...*

*Ao meu querido Beto
pelo amor e pela vida compartilhados; pelo
incentivo e apoio em todos os momentos...*

*A minha muito amada Marina por encher nosso lar de alegria,
e por fazer tudo na vida valer a pena...*

AGRADECIMENTOS

Ao querido Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, por ser meu mestre, orientador, amigo e constante incentivador durante estes mais de 20 anos de convívio. Meu muito obrigada e eterna admiração.

Ao querido Prof. Dr. Telésforo Bacchella pela amizade e incentivo sempre oferecidos durante todos estes anos, meu agradecimento.

Às queridas amigas Ana Maria de Mendonça Coelho, Nilza Aparecida Trindade Molan, Sandra Nassa Sampietre pela amizade de tantos anos.

Aos queridos amigos do Transplante de Fígado: Marcel Autran Cesar Machado, Edson Abdala, Wellington Andraus, Fábio Ferreira Makdissi, Flavio Galvão, Vinicius Rocha Santos, Roberto Meirelles, Roberto Teixeira, Rodrigo Bronze, André Cosme Oliveira, Estela Filgueiras, Ana Lúcia Bernardes, Alcione Sanches Alexandre, pela amizade sempre presente.

Aos meus queridos amigos Dra. Maria Lúcia Cardillo Correa-Giannella e Dr. Daniel Giannella Neto, pela constante contribuição na elaboração deste trabalho, assim como, na escrita do artigo científico. Minha admiração e sincera amizade sempre a vocês.

A minha querida amiga Sandra Valéria de Sá, um super obrigada pela grande ajuda na interpretação dos milhares de dados gerados pelo microarranjo.

Aos queridos amigos Marta Bellodi Privato e José Tadeu Stefano por tantas conversas boas e boas risadas, os “microarrays”, as muitas análises

estatísticas enfim, pela nossa amizade e gostoso convívio nestes últimos dois anos.

Ao prezado Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pela oportunidade de realizarmos trabalhos juntos, em especial este estudo. Muito obrigada pela disponibilidade de sua equipe do LIM-14 nas análises imunohistoquímicas. Um agradecimento especial à farmacêutica Alda Wakamatsu.

Ao querido amigo Dr. Iberê Cauduro Soares por ter me apresentado ao mundo da Imunohistoquímica e principalmente, dos microarranjos teciduais, sempre com muito profissionalismo e valiosas considerações. Muito obrigada.

Aos queridos amigos do LIM-25, Ricardo Rodrigues Giorgi, Maria Ângela Henriques Zanella Fortes, Ana Mercedes de Sousa Cavaleiro e Noriza Amadeo Herrera pela amizade e grandes ajudas.

A toda equipe da Biblioteca da FMUSP, em especial às sempre amigas Valéria Vilhena e Marinalva de Souza Aragão.

À amiga Eliane Falconi Monico Gazetto, secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da FMUSP, pela presteza e contribuição nos processos relacionados à pós-graduação.

***“ Uma verdadeira viagem de descobrimento não significa,
necessariamente, encontrar novas terras mas, isto sim,
adquirir um novo olhar”***

Marcel Proust

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Comittee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de Símbolos	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Resumo	
Summary	

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	15
3. MÉTODOS	17
3.1 Casuística	18
3.2 Identificação de genes diferencialmente expressos	22
3.2.1 Perfil de expressão em microarranjos	22
3.2.2 Extração de RNA total	25
3.2.3 Purificação do RNA	27
3.2.4 Preparação das amostras para síntese da primeira fita de cDNA	28
3.2.5 Síntese de cDNA e cRNA marcados com biotina	30
3.2.5.1 Síntese da primeira fita de cDNA.....	30
3.2.5.2 Síntese da segunda fita de cDNA.....	31
3.2.6 Purificação da fita dupla de cDNA	31
3.2.7 Síntese de cRNA – Transcrição <i>in vitro</i>	32
3.2.7.1 Recuperação do cRNA marcado com biotina	32
3.2.7.2 Fragmentação do cRNA	33
3.2.7.3 Preparação das soluções para reação de hibridização.....	34
3.2.8 Hibridização das lâminas.....	34
3.2.9 Processamento pós-hibridização.....	35
3.2.10 Procedimento para lavagem das lâminas de microarranjos	36
3.2.11 Leitura das lâminas de microarranjos.....	37

3.3	Análise do perfil de expressão gênica por microarranjos	39
3.4	Arranjo em matriz tecidual (TMA).....	41
3.5	Técnica Imunohistoquímica.....	43
3.6	Interpretação dos resultados imunohistoquímicos	46
3.7	Análise Estatística	48
4.	RESULTADOS	49
4.1	Análise dos genes diferencialmente expressos e vias metabólicas moduladas.....	50
4.2	Resultado da análise imunohistoquímica	55
5.	DISCUSSÃO	64
6.	CONCLUSÃO	79
7.	ANEXOS.....	81
8.	REFERÊNCIAS	89

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
μ	micra
$<$	menor que
$=$	igual a
$>$	maior que
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\sim$	aproximadamente
h	hora
kg	quilograma
M	molar
mL	mililitro
mM	milimolar

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	adenosina difosfato
AGL	ácidos graxos livres
AKT	<i>serine-threonine specific kinase</i>
ALT	alanina amino transferase
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AST	aspartato amino transferase
ATP	adenosina trifosfato
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CBP	cirrose biliar primária
CEP	colangite esclerosante primária
CHC	carcinoma hepatocelular
Cripto	cirrose criptogênica
cRNA	ácido ribonucleico complementar
DE	diferencialmente expresso
Def α 1 AT	deficiência alfa 1 antitripsina
DHGA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatados
DO	densitometria ótica
EGF	fator de crescimento epidérmico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EHNA	esteatohepatite não alcoólica
EIF4EBP-1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
et al.	e outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HAI	hepatite autoimune
IMH	imunohistoquímica

HNE	hidroxinonenal
IL	interleucina
IRS-1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
IRS-2	<i>insulin receptor substrate 2</i>
MDA	malonaldialdeído
min	minutos
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFkB	<i>nuclear factor kappa B</i>
pb	pares de bases
PBS	salina tamponada com fosfato
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
qsp	quantidade suficiente para
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	fator de crescimento transformante- β
TMA	<i>tissue microarray</i>
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UTR	<i>untranslated terminal region</i>
UV	ultra-violêta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. História natural da doença hepática gordurosa não alcoólica.	6
Figura 2. Diagrama esquemático da patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica.....	8
Figura 3. Fotomicrografias para confirmação histopatológica por hematoxilina-eosina (HE).....	20
Figura 4. Fluxograma dos passos realizados para o experimento de microarranjo e análise dos dados em nosso estudo.....	24
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a integridade dos RNAs extraídos	27
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a fragmentação do cRNA.....	33
Figura 7. <i>Software CodeLink Expression Analysis</i>	38
Figura 8. Vista panorâmica dos cortes histológicos dos blocos de TMA.....	42
Figura 9. Controle positivo das proteínas 4EBP-1 e 4EBP-1 fosforilado.....	45
Figura 10. Controle positivo das proteínas mTOR e mTOR fosforilado	45
Figura 11. Dendrograma representando o agrupamento hierárquico dos 244 genes diferencialmente expressos.....	52
Figura 12. Imunoexpressão citoplasmática/nuclear de 4EBP-1	59
Figura 13. Imunoexpressão citoplasmática/nuclear de 4EBP-1 fosforilado ..	60
Figura 14. Imunoexpressão citoplasmática de mTOR	61
Figura 15. Imunoexpressão citoplasmática/membrana de mTOR fosforilado	62
Figura 16. Representação esquemática da via de sinalização do mTOR....	68
Figura 17. Mecanismos de indução da tradução protéica pelo mTOR.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos três pacientes portadores de cirrose secundária a EHNA.....	21
Tabela 2. Especificações do sistema <i>CodeLink Human Whole Genome Bioarray</i>	24
Tabela 3. Principais classes funcionais presentes na plataforma de expressão gênica <i>CodeLink Human Whole Genome Bioarray</i>	25
Tabela 4. Anticorpos monoclonais utilizados nas reações de imunohistoquímica, bem como seus clones, diluições e fornecedor.....	47
Tabela 5. Vias com genes diferencialmente expressos segundo análise pelo banco de dados <i>Gene Ontology Consortium</i> (GO).	53
Tabela 6. Vias moduladas com expressão aumentada na cirrose hepática secundária a EHNA em comparação ao tecido hepático normal ...	54
Tabela 7. Vias moduladas com expressão diminuída na cirrose hepática secundária a EHNA em comparação ao tecido hepático normal ...	55
Tabela 8. Análise imunohistoquímica qualitativa referente à imunorreatividade das proteínas estudadas	56
Tabela 9. Médias dos valores referentes aos escores imunohistoquímicos para cada uma das proteínas estudadas nos respectivos TMAs	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Etiologias de cirrose.....	41
Gráfico 2. Escore imunohistoquímico para 4EBP-1	59
Gráfico 3. Escore imunohistoquímico para 4EBP-1 fosforilado	60
Gráfico 4. Escore imunohistoquímico para mTOR	61
Gráfico 5 (A e B). Escore imunohistoquímico para mTOR fosforilado	62
Gráfico 6 (A e B). Escore imunohistoquímico para 4EBP-1 e 4EBP-1 fosforilado.....	63

RESUMO

Kubrusly MS. *Identificação de genes diferencialmente expressos na cirrose secundária à esteato-hepatite não alcoólica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 100p.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende um amplo espectro morfológico de doenças com potencial de progressão em pacientes sem história de etilismo. Pode evoluir para esteatohepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Com intuito de investigar as diferenças genéticas entre tecido hepático normal e cirrose secundária a EHNA, utilizamos microarranjos de oligonucleotídeos (*CodeLink Uniset Human Whole Genome Bioarray System GE Healthcare - Bio-Sciences, Chalfont St. Giles, UK*) para caracterizar os perfis de expressão nas duas condições. Analisamos 3 amostras de cirrose secundária a EHNA e 3 amostras de fígado normal provenientes de doadores durante o transplante hepático. Para a análise dos dados utilizamos o programa *Genesifter™ analysis* (VizX Labs LLC, Seattle, WA, USA; <http://www.genesifter.net>) para identificar os genes diferencialmente expressos e também as vias biológicas moduladas de acordo com a ontologia gênica. Posteriormente, para avaliarmos a expressão imunohistoquímica utilizamos a técnica de microarranjo tecidual em amostras de fígado normal (n=12), cirrose secundária a EHNA (n=10) e cirroses de outras etiologias (n=37). Identificamos 244 genes significativamente alterados em pelo menos 2 vezes. Destes, 138 genes apresentavam-se com expressão aumentada e 106 genes com expressão diminuída na cirrose secundária a EHNA comparados ao fígado normal. Foram selecionadas 9 vias metabólicas significativamente desreguladas. Dentre estas vias identificadas na cirrose secundária a EHNA, selecionamos a via de sinalização do mTOR e seu efetor 4EBP-1 para a análise da expressão protéica. Houve aumento significativo na expressão de 4EBP-1 no fígado normal comparado às outras cirroses, assim como na cirrose secundária a EHNA *versus* outras cirroses. Quanto à forma fosforilada houve apenas diferença na expressão entre fígado normal e cirroses de outras etiologias. A expressão de mTOR mostrou aumento significativo entre cirroses de outras etiologias quando comparadas ao fígado normal e cirrose secundária a EHNA. A expressão de mTOR fosforilado foi maior na cirrose secundária a EHNA quando comparada às cirroses de outras etiologias e fígado normal. Estudos recentes têm sugerido o papel do mTOR na DHGNA e o presente estudo corrobora a participação desta via também na cirrose secundária a EHNA. A avaliação imunohistoquímica de 4EBP-1 e mTOR fosforilado pode ser útil clinicamente para o diagnóstico diferencial entre cirrose secundária a EHNA *versus* cirroses de outras etiologias, quando a etiologia é desconhecida.

Descritores: 1.Cirrose 2.Expressão gênica 3.Imunohistoquímica

SUMMARY

Kubrusly MS. *Identification of differentially expressed genes in NASH-related cirrhosis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 100p.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses the whole spectrum of steatosis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and NASH-related cirrhosis (NASH/Cir). NASH/Cir can progress to hepatocellular carcinoma and reoccur post transplantation. Although molecular advances have been made in this field, the pathogenesis of NAFLD is not completely understood. In an effort to investigate genetic differences between normal liver and NASH/Cir, first we used cDNA microarray (CodeLink Uniset Human Whole Genome Bioarray System GE Healthcare - Bio-Sciences, Chalfont St. Giles, UK) in normal liver from donor liver wedge biopsies taken at transplantation (n=3) and confirmed NASH/Cir tissues (n=3) and Genesifter™ analysis (VizX Labs LLC, Seattle, WA, USA; <http://www.genesifter.net>) to identify differentially expressed genes and biological pathways according to gene ontology (GO). Second, tissue microarray was used to determine immunohistochemical expression in normal liver samples (n=12), NASH/Cir (n=10) and in cirrhosis of other etiologies (n=37). Analysis of microarray data resulted in 244 genes changed in at least 2-fold with statistically significant ratio: 138 and 106 genes were, respectively, up and downregulated in NASH/Cir in comparison to normal liver. GO analysis by GeneSifter™ software identified nine statistically significant pathways containing differentially expressed genes. Among the 9 pathways identified as significantly modulated in NASH/Cir, we selected mTOR pathway and its downstream effector for immunohistochemical analysis. There was a significant increase in the expression of 4EBP-1 in normal liver compared to the other cirrhosis, as well as to NASH/Cir versus other cirrhosis. The phosphorylated 4EBP-1 showed only difference in expression between normal liver and cirrhosis of other etiologies. The expression of mTOR showed a significant increase in other cirrhosis when compared with normal liver and NASH/Cir. The expression of phosphorylated mTOR was higher in NASH/Cir when compared to other cirrhosis and normal liver. Recent findings have suggested a role for the cellular nutrient sensor mTOR in NAFLD and the present study corroborates the participation of this pathway in NASH/Cir. 4EBP-1 and phospho-mTOR evaluation might be of clinical utility as differential diagnostic of NASH/Cir from other cirrhosis, without knowing etiology.

Descriptors: 1.Cirrhosis 2.Gene expression 3.Immunohistochemistry

1.

INTRODUÇÃO

O registro de alterações anatômicas, como aumento da consistência e diminuição do volume do fígado, é encontrado em documentos da antiguidade. O primeiro médico a reconhecer o endurecimento hepático como um sinal de mau prognóstico, quando associado à icterícia, foi Hipócrates (460 aC). Já no século XV da era cristã, Leonardo da Vinci descreveu características importantes da anatomia normal e de alterações morfométricas no fígado de alguns indivíduos. No entanto, somente no ano de 1819, René Laënnec estabeleceu pela primeira vez a correlação entre o quadro anatomopatológico e a síndrome clínica, sugerindo a denominação cirrose, palavra originária do vocábulo grego *kirrhos*, que significa “amarelo cor-de-palha” (Mincis, 2005).

Com os avanços da medicina no início do século XX, Robert Rossle (1930) elucidou a patogenia da cirrose descrevendo a ocorrência de pelo menos três fenômenos fundamentais: a lesão hepatocelular, a proliferação do tecido conjuntivo e a tendência dos hepatócitos a uma regeneração nodular irregular.

Considera-se a cirrose uma doença grave, por ser uma condição terminal de diversas doenças hepáticas, sendo a principal indicação para transplante hepático em adultos. Independentemente de sua etiologia, apresenta-se hoje como um dos processos degenerativos mais preocupantes, pela sua elevada incidência global e por seu mau prognóstico (Friedman, 2003).

A cirrose afeta centenas de milhares de pacientes no mundo inteiro, sendo que nos Estados Unidos é a causa mais comum de morte entre as doenças hepatobiliares e digestivas de origem não-neoplásica. Naquele país, é responsável por cerca de 30.000 mortes/ano, às quais se deve acrescentar 10.000 mortes por carcinoma hepatocelular, sendo que a maioria origina-se em fígados cirróticos (Befeler, 2002; Friedman, 2003; Befeler, 2005).

Dentre suas principais etiologias podemos destacar o etilismo crônico, as hepatites crônicas virais B e C, a hepatite autoimune, a obstrução dos ductos biliares, a doença de Wilson, a hemocromatose, drogas, toxinas, a fibrose cística, a deficiência de alfa-1-antitripsina e os distúrbios metabólicos, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Quando são excluídas todas as etiologias conhecidas e após minuciosa avaliação do paciente, a cirrose é denominada idiopática ou criptogênica (Angulo, 2002; Bugianesi, 2002). A determinação etiológica da cirrose tem importância na avaliação prognóstica e na escolha das opções terapêuticas. Sabe-se, ainda, que a etiologia da cirrose tem influência no padrão molecular de progressão para o carcinoma hepatocelular (El-Serag, 2007).

Mesmo comprometendo difusamente o fígado, levando à alterações funcionais e de suprimento sanguíneo, a cirrose pode permanecer assintomática por vários anos, devido a grande capacidade de reserva e de regeneração do fígado (Taub, 2004; Fausto, 2006).

Dentre as doenças hepáticas crônicas, a DHGNA, inicialmente considerada uma condição benigna, é a doença hepática mais comum nos países desenvolvidos. Compreende um amplo espectro morfológico de

doenças com potencial de progressão em pacientes sem ingestão etílica significativa. Apresentam-se desde casos de esteatose simples sem inflamação, até casos de esteatohepatite e fibrose, podendo evoluir para cirrose e finalmente, carcinoma hepatocelular. Apesar de ter sido descrita há mais de 25 anos por Ludwig et al. (1980), somente nos últimos anos sua significância clínica começou a ser reconhecida (Hubscher, 2006). Sua etiologia é multifatorial e está relacionada principalmente à síndrome metabólica (obesidade, diabetes tipo 2, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão) (Youssef, 2002; Angelico, 2005).

Uma característica comum aos pacientes portadores de DHGNA é o excesso de ácidos graxos livres (AGL). Uma das causas mais prováveis para a esteatose hepática é um influxo aumentado de AGL nos hepatócitos, o qual geralmente ocorre através da difusão pela membrana. Ao entrarem nas células, os AGL são rapidamente modificados pela acyl-coenzima A sintetase e não são mais disponíveis para transporte ou difusão. A maioria dos AGL em excesso é convertida em triglicerídeos e estocada em gotículas de gordura. A exportação de gordura pelo fígado pode estar também prejudicada na DHGNA, em função de defeito na incorporação de triglicerídeos na apolipoproteína B ou na síntese ou excreção de apolipoproteína B (De Gottardi, 2007).

Estudos sugerem que a obesidade e a resistência à insulina estejam envolvidas na patogênese da DHGNA como fator desencadeante para o acúmulo de lipídio no hepatócito (Bugianesi, 2005). No entanto, fatores de riscos ambientais e genéticos parecem influenciar a gravidade da esteatose,

do estresse oxidativo e a magnitude da resposta inflamatória e, ou também, a gravidade da fibrose (Day, 2006b). A hiperinsulinemia promove a lipogênese *de novo* por regulação aumentada de fatores de transcrição lipogênicos. A resistência à insulina pode também estar associada à expressão diminuída dos substratos dos receptores de insulina, os quais modulam o metabolismo lipídico.

A esteatohepatite não alcoólica (EHNA), propriamente dita, é caracterizada histologicamente por esteatose macro e microvesicular, infiltrado inflamatório lobular (com população mista de neutrófilos, linfócitos e macrófagos/células de Kupffer), balonização hepatocelular em zona III, podendo apresentar fibrose com distribuição perissinusoidal e, ou também, pericelular, corpúsculos de Mallory e evoluir para cirrose (com padrão inicialmente micronodular e com evolução para macronódulos) (Brunt, 1999). Estes aspectos histopatológicos típicos tornam-se menos frequentes e podem até desaparecer uma vez estabelecida a cirrose.

McCullough et al. (2006) relataram que 15 a 25% dos pacientes portadores de EHNA desenvolvem cirrose, e 30 a 40% desses apresentam insuficiência hepática antes de completar 10 anos de diagnóstico. Em recente estudo, Day (2008) propôs novas frequências na progressão da DHGNA num seguimento de 1 a 15 anos com dados de diferentes estudos (Figura 1). Este autor verificou que 12-40% dos casos de esteatose hepática evoluem para esteatohepatite e destes apenas 5-10% evoluem para cirrose hepática, o que demonstra ser a doença heterogênea e sua evolução dependente de múltiplos fatores.

Figura 1. História natural da doença hepática gordurosa não alcoólica. Seguimento de 1 a 15 anos em diferentes estudos. Adaptado de Day, 2008.

Sanyal et al. (2006) concluíram que a cirrose secundária a EHNA está associada a menor índice de mortalidade comparada à cirrose por vírus C. Apresenta também menor formação de ascite, hiperbilirrubinemia e carcinoma hepatocelular, porém a morbi-mortalidade por alterações cardiovasculares é bem maior nos pacientes com EHNA.

Ainda em relação à evolução para cirrose, é interessante salientar o trabalho de Caldwell et al. (1999) que revisaram 102 casos diagnosticados como cirrose criptogênica. Os autores observaram grande predomínio de mulheres obesas, com diabetes melitus e idade mais avançada, sugerindo que muitos casos diagnosticados como cirrose criptogênica poderiam ser, na realidade, secundários a EHNA. Corroborando com estas evidências, estudo

retrospectivo caso-controle, demonstrou que a prevalência de obesidade e de diabetes está aumentada em pacientes com cirrose considerada criptogênica (Poonawala, 2000).

Embora já se conheçam os fatores predisponentes, e se saiba que a esteatose possa evoluir para cronicidade, a verdadeira relação causal entre esteatose, EHNA, fibrogênese, cirrose e carcinoma hepatocelular, assim como sua patogênese, ainda não estão totalmente esclarecidas.

Day e James em 1998 propuseram a teoria dos dois estímulos na fisiopatogênese da DHGNA e sua progressão para EHNA, onde a resistência à insulina é condição inicial para o desenvolvimento da esteatose (primeiro estímulo), com acúmulo de ácidos graxos em mais de 5% dos hepatócitos, aumentando a sensibilidade hepática aos estímulos subsequentes, tais como: estresse oxidativo associado à lipoperoxidação (segundo estímulo) para o desenvolvimento de inflamação e fibrose.

Apesar do estresse oxidativo e das citocinas ainda permanecerem com seu papel central na evolução da DHGNA, diversos estudos de revisão (Chitturi, 2001; Angulo, 2002; Day, 2006 a,b; Federico, 2006; Alwis, 2007) têm sido publicados na tentativa de se compreender melhor o modelo inicial proposto para explicar sua patogênese (Figura 2). As considerações mais relevantes são devidas ao maior entendimento da origem do estresse oxidativo e das citocinas e em particular, o proeminente papel da resistência à insulina, dos ácidos graxos livres e da inflamação do tecido adiposo, o qual produz e secreta substâncias bioativas como as adipocitocinas (Sanyal, 2001).

Figura 2. Diagrama esquemático da patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica. Modificado de Federico ,2006.

AGL (ácidos graxos livres); RE (retículo endoplasmático); ATP (adenosina trifosfato); MDA (malondialdeído); HNE (hidroxi nonenal); NFkB (fator nuclear kappa B); TNF- α (fator de necrose tumoral α); EHNA (esteatohepatite não alcoólica); TGF- β (fator de crescimento transformante β); IL (interleucina); PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*); CHC (carcinoma hepatocelular).

O acúmulo excessivo de triglicérides no fígado é influenciado pela resistência à insulina, modulado principalmente pelas adipocitocinas e disfunção na síntese e transporte de triglicéride celular. Variações genéticas nos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2), que fazem parte da via de sinalização do receptor de insulina ou na proteína microssomal transportadora de triglicérides (MTP) levam ao acúmulo excessivo de gordura no fígado.

O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, consequente ao excesso de ácidos graxos no hepatócito direcionados para a mitocôndria para serem oxidados, seria importante na evolução da esteatose para EHNA e fibrose. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares anti-oxidantes são insuficientes para detoxificar as espécies reativas de oxigênio ou, também quando há produção excessiva das mesmas. Dentro deste contexto, o aporte excessivo de ácidos graxos ao fígado pode promover esgotamento da capacidade de oxidação mitocondrial bem como, a ativação de outras vias de oxidação lipídica (peroxissomal e microssomal), que geram por sua vez mais espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo hepático (Nieto, 2002).

Foi demonstrado em artigo de revisão por Pessayre et al. (2001), o papel central da lipoperoxidação mediada pelas espécies reativas de oxigênio na EHNA. A peroxidação das membranas plasmática e mitocondrial pode causar necrose e, ou também, apoptose e formação de megamitocôndria (Le, 2004). Os produtos finais da lipoperoxidação, 4-hidroxinonenal e malonaldialdeído ligam-se covalentemente a proteínas hepáticas, formando adutos capazes de iniciar uma resposta imune potencialmente lesiva. Podem, ainda, estimular a síntese de proteínas da matriz extracelular pelas células estreladas do fígado e interligação de citoqueratinas para a formação de corpúsculos de Mallory.

A subsequente liberação de citocinas pelos hepatócitos, em particular o TNF- α , ativa células inflamatórias, incluindo células de Kupffer, que produzem mais citocinas capazes de induzir a lesão hepática com necrose, e ou,

também apoptose em conjunto com o estresse oxidativo levando ao aumento da oxidação dos ácidos graxos livres (Cai, 2005). Além disso, estudos em pacientes com obesidade relacionada a EHNA quando comparados a obesos sem EHNA mostram aumento na expressão de TNF- α e seus receptores tanto no tecido adiposo quanto no fígado; expressão esta, correlacionada com a gravidade histológica (Youssef, 2002; Yudkin, 2007).

Outro mecanismo que vem ganhando especial destaque para o entendimento da fisiopatogênese da EHNA, é o estresse do retículo endoplasmático (RE). Sabe-se que o RE é uma organela responsável pela síntese e enrolamento de proteínas secretoras. Cerca de noventa e cinco % das proteínas presentes nas células estão na sua conformação normal, ou seja apresentam-se enroladas, enquanto os outros 5% correspondem a proteínas desenroladas (*unfolded proteins*) e mal enroladas (*misfolded proteins*). O acúmulo destas proteínas no lúmen da organela causa o chamado estresse do RE, desencadeando uma série de mecanismos e reações denominada UPR (*unfolded protein response*), ou resposta a proteínas desenroladas, um processo fisiológico normal. O UPR diminui este estresse através da atenuação da tradução, da ativação de genes alvos do UPR, da degradação das vias no RE e da inibição da síntese protéica. Porém, quando as funções do RE são afetadas, este inicia os sinais apoptóticos (Ji, 2006).

Na fisiopatogênese da EHNA, o estresse do RE pode funcionar como um potencial “terceiro” estímulo à lesão hepática, onde vários estudos sugerem seu importante papel na apoptose como um mecanismo de morte do hepatócito na EHNA (Feldstein, 2003). A evidência deste papel é

derivada de algumas observações. Primeiro, o estresse do RE é fortemente reconhecido como um importante mecanismo nas doenças hepáticas alcoólicas. Segundo, o estresse do RE mostra-se como uma característica da obesidade, relacionando-a com resistência à insulina e desenvolvimento de diabetes e terceiro, alterações nutricionais, como o acúmulo de ácidos graxos saturados induz ao estresse do RE e apoptose nos hepatócitos (Ozcan, 2004).

Considera-se atualmente, que a esteatose funcione mais como um epifenômeno de mecanismos de lesão do que um verdadeiro “primeiro estímulo” envolvido no desenvolvimento da lesão hepática progressiva e consequentemente, não ser um alvo para tratamento (Day, 2006a).

Dado os escassos conhecimentos fisiopatológicos acerca da DHGNA, assim como a não identificação de genes relacionados à progressão para EHNA, fibrose e cirrose, uma série de estudos moleculares, em modelos animais e humanos, vem sendo realizada na tentativa de um melhor entendimento dos processos envolvidos na patogênese molecular da DHGNA e identificar possíveis alvos para abordagens terapêuticas (Baranova, 2005; Younossi, 2005 a,b; Lemmer, 2006; Baranova, 2007; Rubio, 2007). É provável que fatores genéticos estejam envolvidos na etiopatologia da cirrose nestes casos. Ter a capacidade de determinar e entender estes fatores responsáveis pela evolução mostra-se, portanto, essencial.

A genômica funcional tem se mostrado como uma das novas áreas interdisciplinares, nas quais a genética, a bioquímica, a matemática e a informática se encontram. Esta ciência se vale de tecnologias, tal como a

análise de expressão gênica via hibridização em microarranjo (Schena, 1995), considerada hoje uma boa alternativa para análise quantitativa dos níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente, permitindo a avaliação global da expressão gênica em tecidos ou células em diferentes situações e favorecendo o entendimento de como os genes trabalham e guiam as funções celulares e como pequenas alterações e variações levam a processos patológicos (Kuo, 2004).

Os estudos mais comuns são os de transcriptoma ou análise de transcritos em larga escala, onde os mRNA das condições teste e controle são submetidos à transcrição reversa e marcados com diferentes fluoróforos. Após a hibridização dos cDNAs marcados, a lâmina é varrida por laser, gerando imagens independentes para as amostras teste e controle. As imagens obtidas são usadas para quantificar a intensidade de fluorescência de cada ponto, permitindo obter-se a relação entre a fluorescência nas duas condições e assim, determinar o nível relativo de expressão dos genes (Schena, 1995).

Nos últimos anos, pesquisadores têm dedicado grandes esforços na padronização dos dados gerados a partir deste tipo de experimento, tanto pela sua importância como pelo fato de possibilitar que os resultados obtidos a partir de experimentos diferentes possam ser comparados.

Com a intenção de organizar os dados gerados e disponibilizar de forma ordenada as informações, um grupo de especialistas (Brazma, 2001) pertencentes ao *The Microarray Gene Expression Data Society* (MGED) elaborou um protocolo conhecido como MIAME

(*Minimum Information About A Microarray Experiment*), que é composto basicamente por 6 seções: (1) desenho do experimento; (2) desenho do array; (3) amostras usadas, extração e hibridização das amostras; (4) procedimentos e parâmetros da hibridização; (5) imagem, quantificação e parâmetros de medida; e (6) tipos, valores e especificações dos controles de normalização (Anexo A).

A normalização é necessária para permitir a comparação direta do padrão de expressão e deve ser efetuada tanto entre amostras no mesmo arranjo quanto para o conjunto de experimentos. A filtragem, através de critérios pré-selecionados, é importante para restringir o volume de dados; por exemplo, quando se consideram apenas os genes expressos com valores iguais e, ou também maiores que determinado valor estipulado pelo pesquisador e desconsideram-se aqueles que não apresentarem variação do nível de expressão entre os tratamentos. O último passo talvez seja o mais complexo, porém de suma importância. Encontrar o padrão ou os grupos de dados que poderão ser usados para a determinação do significado biológico dentro de enorme volume de dados.

Grande parte dos estudos de expressão gênica está concentrada na identificação de genes diferencialmente expressos, mas além da expressão diferencial, é importante saber a que vias seus respectivos produtos gênicos pertencem.

Para o conhecimento destas vias, utiliza-se o GO (*Gene Ontology*), que consiste na organização de um vocabulário controlado, estruturado,

precisamente definido e comum para descrever o papel dos genes e proteínas/RNAs de qualquer organismo. O projeto começou há dez anos com uma colaboração entre três bancos de dados de organismos e desde então, o GO *Consortium* cresceu para incluir novos bancos de dados. É estruturado em três ontologias independentes - processo biológico, função molecular e componente celular. O processo biológico é formado por um ou mais conjuntos de funções moleculares. A função molecular é a atividade ou tarefa que a proteína/RNA realiza. Esta ontologia descreve somente o que é feito, sem especificar aonde ou quando o evento realmente acontece. O componente celular refere-se à localização na célula, considerando subestruturas celulares (Ashburner, 2000).

Uma das aplicações práticas, mais óbvias, de tais estudos utilizando a tecnologia de microarranjos é a tentativa de identificar marcadores precoces dos processos patológicos, que permitam avaliar a predisposição do paciente a determinada evolução da doença e a possibilidade de intervenção terapêutica no início do processo.

Apesar de diversos estudos avaliarem a expressão gênica diferencial em portadores de DHGNA e EHNA (Sreekumar, 2003; Younossi, 2005 a,b; Yoneda, 2006; Taniai, 2006), há escassas informações acerca dos doentes com cirrose estabelecida. Dado o fato de que nem todos os doentes que apresentam DHGNA e EHNA evoluem para cirrose (Figura 1), o estudo destes em particular, é de fundamental importância para aumentar o conhecimento dos mecanismos moleculares que participam desta progressão.

2.

OBJETIVOS

- Identificar genes diferencialmente expressos em amostras de fígado de pacientes portadores de cirrose secundária a EHNA comparados a amostras de fígado normal.
- Selecionar vias metabólicas desreguladas na cirrose secundária a EHNA.
- Validar por imunohistoquímica a expressão protéica de alguns genes selecionados no experimento de microarranjo.

3.

MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram utilizadas amostras de tecido hepático de três pacientes com diagnóstico de cirrose hepática secundária a EHNA, sendo dois do sexo masculino e um do sexo feminino (média de idade de 63 anos), acompanhados no ambulatório do Serviço de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da FMUSP. Três amostras de tecido hepático normal de doadores foram obtidas por biópsia realizada durante a realização de transplante hepático pela equipe médica do Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da FMUSP, sendo dois indivíduos do sexo masculino e um do sexo feminino com média de idade de 44 anos. Triplicatas biológicas foram utilizadas para reduzir os efeitos das diferenças fenotípicas individuais de cada grupo.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental - LIM/37 Setor de Biologia Molecular, Disciplina de Transplante de Fígado - FMUSP/Departamento de Gastroenterologia. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FMUSP, sob protocolo de pesquisa nº 634/06 (Anexo B).

Os fragmentos de tecido hepático foram coletados em tubos criogênicos estéreis, identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e permaneceram em freezer -80 °C até seu uso.

A caracterização e confirmação histológica de cirrose hepática secundária a EHNA foram realizadas por um único observador, um hepatopatologista experiente, segundo a rotina da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Como critério diagnóstico histológico de EHNA, foram consideradas a presença de esteatose macrovesicular (escore 0-3) associada a infiltrado inflamatório lobular (escore 0-3), com ou sem fibrose perissinusoidal e lesão hepatocelular. A lesão hepatocelular foi definida como degeneração balonizante (escore 0-2) dos hepatócitos, utilizando-se a classificação de Brunt et al. (1999). De acordo com publicação recente pelo *Committee of the NASH Clinical Research Network* (Kleiner, 2005) considera-se um escore ≥ 4 consistente com EHNA. Dois dos três pacientes apresentaram escore 4 na avaliação anatomopatológica realizadas nos cortes de fígado durante o transplante e o terceiro paciente apresentou escore 3, porém uma biópsia prévia realizada 3 anos antes apresentava um escore de 6, confirmando portanto, o diagnóstico de cirrose secundária a EHNA. Na Figura 3 mostramos as fotomicrografias das três amostras de fígado normal, onde observamos a veia centrolobular e o espaço porta (A, B e C) evidenciando a arquitetura hepática normal. As seis próximas fotos referem-se aos três tecidos cirróticos confirmados (casos 1, 2 e 3) como cirrose secundária a EHNA. Notam-se os septos fibrosos, nódulos e esteatose micro e macrovesicular (D, E e F). Em aumento maior são evidenciadas a esteatose micro e macrovesicular, assim como corpúsculos de Mallory e hepatócitos balonizados (G, H e I).

A análise foi complementada pela avaliação das seguintes variáveis bioquímicas: sorologia para as hepatites B e C (anti-HBc, HBsAg e anti-HCV), auto-anticorpos (fator antinuclear, anticorpo antimúsculo liso e anticorpo antimitocôndria), perfil de ferro, cobre sérico e urinário, ceruloplasmina, pesquisa de alfa-1-antitripsina, avaliação do índice de massa corpórea (IMC), presença de síndrome metabólica e, ou também, diabetes (Tabela 1).

Figura 3. Fotomicrografias para confirmação histopatológica por hematoxilina-eosina (HE) das amostras de tecido hepático normal e cirrótico utilizadas no experimento de microarranjo.

- A, B e C:** Tecido hepático normal (veia centrolobular e espaço porta) (aumentos de 100 e 400X)
- D, E e F:** Tecido hepático cirrótico (casos 1, 2 e 3 respectivamente) onde se notam septos fibrosos, nódulos e esteatose micro e macrovesicular (aumento de 40X)
- G, H e I:** Tecido hepático cirrótico (casos 1, 2 e 3) evidenciando esteatose micro e macrovesicular, corpúsculos de Mallory e células balonizadas (aumentos de 100, 200 e 400X)

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos três pacientes portadores de cirrose secundária a EHNA

PARÂMETROS	PACIENTE 1	PACIENTE 2	PACIENTE 3
Idade	61	62	65
Sexo	Masculino	Feminino	Masculino
IMC (kg/m²)	28	34,7	34
Glicose	104	DM	148
ALT	66	44	45
AST	53	32	27
Anti-HBc total	neg	neg	neg
Anti-VHC	neg	neg	neg
Hemocromatose	não	não	não
Def α 1 AT	não	não	não
Autoanticorpos	neg	neg	neg
Perfil de cobre	nl	nl	nl
Perfil de ferro	nl	nl	nl

IMC: índice de massa corpórea; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato amino transferase; anti-HBc: anticorpos contra o antígeno *core* da hepatite B; anti-VHC: anticorpos contra o vírus da hepatite C; Def α1 AT: deficiência de alfa 1 antitripsina; neg: negativo; nl: normal.

3.2 Identificação de genes diferencialmente expressos

3.2.1 Perfil de expressão em microarranjos

Na Figura 4 esquematizamos todas as passagens realizadas no experimento de microarranjo para este estudo. Para identificação de genes diferencialmente expressos foi utilizada a plataforma de expressão *CodeLink Uniset Human Whole Genome Bioarray System* (GE Healthcare - Biosciences, Chalfont St. Giles, UK), que permite o monitoramento dos níveis de RNAs mensageiros de múltiplos genes simultaneamente com alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar um único transcrito por célula. Este sistema está disposto em lâminas de vidro (câmeras) revestidas com uma matriz tridimensional de poliacrilamida, onde oligonucleotídeos com 30 pares de base (pb) de aproximadamente 55.000 transcritos estão covalentemente fixados. Estas sondas foram validadas com bases em diversos bancos de dados públicos tais como: *UniGene*, *RedSeq* e *Incyte's Life Seq Gold and Foundation*. Além disto, o sistema utiliza aproximadamente 384 controles negativos, 360 controles positivos (controle *spiked*), que consiste em colocar dois genes controle, um forte e um fraco, sendo o restante dos genes utilizados para completar a amplitude existente desde um até o outro. No método de controles *spiked*, sequências de DNAs sintético ou não de um organismo diferente do que está sendo estudado, são

fixadas na lâmina e incluídas em duas diferentes amostras de mRNAs em quantidades iguais. Espera-se que estas sequências de controle fixadas tenham a mesma intensidade e possam ser usadas na normalização. Ainda na lâmina temos 100 genes considerados constitutivos (*housekeeping genes*) assumidos como constantes em uma ampla variedade de condições (Tabela 2). Na plataforma são selecionados genes pertencentes a processos biológicos relacionados a oncogenes, ciclo celular, sinalização célula-célula, transdutores de sinais, metabolismo, processos de desenvolvimento, transcrição e tradução, resposta inflamatória e imune, fosforilação de proteínas, apoptose, processamento de RNA, transportador de íons, transmissão sináptica e quinase (Tabela 3)

A plataforma *CodeLink*TM é capaz de detectar mínimas diferenças na expressão gênica, com no mínimo, 95% de confiança (Ramakrishnan, 2002). A matriz aquosa de poliacrilamida na qual as sondas, sob a forma de oligonucleotídeos de 30 pb, são fixadas nas extremidades 5', permite interação tridimensional entre os oligonucleotídeos e as sondas de RNA provenientes das amostras em questão. Isso reduz significativamente as eventuais interferências de fundo (*background* inespecífico), aumentando a sensibilidade e permitindo a detecção e a quantificação de genes expressos, em nosso caso, no tecido hepático.

Figura 4. Fluxograma dos passos realizados para o experimento de microarranjo e análise dos dados em nosso estudo. Modificado de Baranova, 2005.

Tabela 2. Especificações do sistema CodeLink Human Whole Genome Bioarray

Número de ensaios no set	1
Número de sondas	54841
Número de transcritos	57347
Número de genes conhecidos	45674 (baseado em Unique UniGene IDs)
Controles positivos	360
Controles negativos	384
Genes constitutivos	100
Número de sondas por gene	Uma sonda específica e funcionalmente validada
Tamanho das sondas de oligonucleotídeos	30-mer
Quantidade amostra RNA	0,2–2 µg RNA total
Tipo de ensaio	Uma cor
Temperatura de estocagem e manuseio	Temperatura ambiente

Tabela 3. Principais classes funcionais presentes na plataforma de expressão gênica *CodeLink Human Whole Genome Bioarray*

Principais Processos Biológicos	Nº de Genes
Oncogenes	~1200
Ciclo celular	~1400
Sinalização célula-célula	~1000
Transdutores de sinais	~3000
Metabolismo	~2000
Processos de desenvolvimento	~1400
Transcrição e tradução	~2700
Resposta inflamatória e imune	~1100
Fosforilação de proteínas	~800
Apoptose	~600
Processamento de RNA	~550
Transportador de íons	~1150
Transmissão sináptica	~400
Quinase	~200

3.2.2 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, o tecido hepático (50mg) foi fragmentado em pulverizador de tecidos (*Micro-Dismembrator II B. Braun Biotech International Melsugen, Alemanha*). Ao material pulverizado adicionou-se 1,0 mL de Trizol[®] (solução ácida monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina/ *Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA*). Para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas, adicionou-se 0,2

mL de clorofórmio (*Merck*) para 1,0 mL de Trizol[®]. Fecharam-se os tubos adequadamente e fez-se uma agitação manual vigorosa por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Centrifugaram-se as amostras durante 15 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Após a centrifugação, observa-se a formação de três fases: a mais inferior fenólica (proteínas), a fase intermediária (DNA) e a superior aquosa (RNA), na qual o volume é constituído por aproximadamente 60% do volume do Trizol[®] acrescentado ao material pulverizado.

Para a precipitação do RNA transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de microcentrífuga e colocou-se 0,5 mL de álcool isopropílico gelado (*Merck*). Incubaram-se as amostras à temperatura ambiente durante 10 min e centrifugaram-se a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Removeu-se o sobrenadante e fizeram-se lavagens do precipitado de RNA com 1,0 mL de etanol 75%. Centrifugou-se por 5 min a 10.000 rpm a 4 °C. O RNA sedimentado no fundo do tubo foi ressuspenso em 50 a 100 µL de água ultrapura estéril livre de DNase/RNase (*Invitrogen*).

A concentração dos RNAs extraídos foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop[™] ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, EUA*) pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, utilizando-se como valor padrão 1 DO₂₆₀=40 µg/mL de RNA. O grau de pureza foi avaliado pela relação 260/280 nm, tendo sido utilizados os RNAs cuja relação foi ≥ 1,8. Para verificar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio 3,0 µg/mL e visualização em

transiluminador de luz UV em comprimento de onda 203 nm. A Figura 5 ilustra a análise da integridade e pureza dos RNAs totais extraídos de tecidos hepáticos normais e cirróticos.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a integridade dos RNAs extraídos de tecido hepático normal (amostras 1, 2 e 3) e tecido hepático cirrótico (amostras 4, 5 e 6) com visualização das bandas 28S e 18S.

3.2.3 Purificação do RNA

Para purificação do RNA fragmentado foi utilizado o *Kit RNeasy Mini* (Qiagen, Valencia, CA), segundo instruções do fabricante, como se segue: dez microgramas do RNA total foram misturados com volume apropriado de água Milli-Q livre de DNase/RNase, para um volume final de 100 μ L. Ao volume de 100 μ L foram adicionados 350 μ L do tampão RLT previamente preparado pela adição de β -mercaptoetanol. Em seguida, foram adicionados 250 μ L de etanol absoluto e homogenizados.

Os 700 µL acima preparados foram passados em mini-coluna *RNeasy* (*Qiagen*) e centrifugados a 10.000 rpm por 15 s. A coluna foi transferida para novo tubo e foram adicionados 500 µL do tampão RPE. A coluna foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores. Foi realizada uma nova lavagem com o tampão RPE e o RNA foi recuperado da coluna com 30 µL de água Milli-Q livre de DNase/RNase, por centrifugação a 10.000 rpm por 1 min. Em seguida, o volume das amostras foi reduzido em concentrador (*SpeedVac Concentrator 5301, Eppendorf*), para se obter a concentração final de 0,1 µg/ µL.

Tampão RLT

10 µL de β-mercaptoetanol por mL de solução RLT

Tampão RPE

Preparado pela adição de 4 volumes de etanol absoluto (100%) ao tampão RPE concentrado para se obter a solução de uso.

3.2.4 Preparação das amostras para síntese da primeira fita de cDNA

Para síntese da primeira fita de cDNA foram inicialmente preparadas amostras de controles bacterianos, que foram adicionadas posteriormente na reação da primeira fita:

Preparação da solução estoque controle de transcritos bacterianos exógenos na concentração de 16,7 ng/μL:

2,5 μL RNAm controle bacteriano *araB* a 0,1 μg/ μL

2,5 μL RNAm controle bacteriano *ent F* a 0,1 μg/ μL

2,5 μL RNAm controle bacteriano *fixB* a 0,1 μg/ μL

2,5 μL RNAm controle bacteriano *gnd* a 0,1 μg/ μL

2,5 μL RNAm controle bacteriano *hisB* a 0,1 μg/ μL

2,5 μL RNAm controle bacteriano *leuB* a 0,1 μg/ μL

Volume final 15 μL

Preparação da solução de controles bacterianos na concentração de 50,2 pg/μL a partir da solução estoque:

Solução estoque 16,2 ng/μL	3 μL
----------------------------	------

Água Milli-Q livre de DNase/RNase	997 μL
-----------------------------------	--------

Volume final	1000 μL
--------------	---------

Preparação da solução de uso:

Solução estoque 50,2 ng/μL	2 μL
----------------------------	------

Água Milli-Q livre de DNase/RNase	998 μL
-----------------------------------	--------

Volume final	1000 μL
--------------	---------

3.2.5 Síntese de cDNA e cRNA marcados com biotina

3.2.5.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Para síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado 1 µg de cada um dos RNAs purificados acima, conforme descrito abaixo:

RNA total purificado	10 µL
Controles bacterianos (<i>spikes</i>)	1 µL
Primer T7-(dT) ₂₄ a 0,5 pmol/µL	1 µL
Água Milli-Q livre de DNase/RNase qsp	12 µL

As amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min em termociclador, e em seguida colocadas em gelo, onde foram adicionados os seguintes reagentes:

Tampão 10X <i>first strand</i>	2 µL
Mistura de dNTPs 5 mM	4 µL
Inibidor de RNase	1 µL
Transcriptase reversa <i>Superscript II</i>	1 µL
Água Milli-Q livre de DNase/RNase qsp	20 µL

A reação acima foi incubada em termociclador a 42 °C por 2 h.

3.2.5.2 Síntese da segunda fita de cDNA

Para síntese da 2ª fita do cDNA foi utilizado o protocolo que se segue:

Primeira fita de cDNA	20 µL
Água Milli-Q livre de DNase/RNase	63 µL
Tampão da segunda fita 10X	10 µL
Mistura de dNTPs 5mM	4 µL
DNA polimerase	2 µL
RNase H	1 µL

A reação acima foi incubada por 2 h a 16 °C em termociclador.

3.2.6 Purificação da fita dupla de cDNA

A purificação da segunda fita de cDNA foi realizada seguindo-se o protocolo do *Kit Qiaquick* (Qiagen). Inicialmente foram adicionados 500 µL de tampão PB ao cDNA preparado acima e misturado. Foi montada uma coluna fornecida pelo *kit* em um tubo de 2 mL. À coluna foi adicionada a reação acima (cDNA e tampão PB). A coluna foi centrifugada por 60 s a 10.000 rpm e o eluato foi descartado.

Foram, então, adicionados 700 µL de tampão PE e a coluna foi novamente centrifugada a 10.000 rpm por 30 s. O eluato da coluna foi novamente desprezado e a coluna transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 30 µL de tampão EB no centro da coluna, e após incubação por 1 min a temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 10.000 rpm durante 1 min. O eluato da coluna foi concentrado em *SpeedVac*, sob aquecimento médio, até o volume final de 9,5 µL.

3.2.7 Síntese de cRNA – Transcrição *in vitro*

Para síntese do cRNA das amostras foi utilizado o *Kit CodeLink Expression Assay Reagent Manual Prep (GE Healthcare)* de acordo com o protocolo do fabricante:

cDNA purificado e concentrado	9,5 µL
Tampão de reação T7 10X	2,0 µL
ATP 75 mM	2,0 µL
GTP 75 mM	2,0 µL
CTP 75 mM	2,0 µL
UTP 75 mM	1,5 µL
Biotina-11-UTP 10 mM	3,75 µL
Mistura da enzima T7	2,0 µL

A mistura acima foi incubada em estufa a 37 °C por 14 h.

Foi utilizado 1µL (500 ng) do plasmídeo pTRI-Xef1 proveniente do *kit* como reação independente e paralela para controle da transcrição *in vitro*.

3.2.7.1 Recuperação do cRNA marcado com biotina

Para se obter a purificação dos cRNAs marcados foi utilizado o *Kit RNeasy Mini (Qiagen)*, seguindo-se o mesmo protocolo descrito no sub item 3.2.3

O cRNA purificado foi estocado a –70 °C até o momento do uso.

3.2.7.2 Fragmentação do cRNA

Após a recuperação do cRNA, o mesmo foi fragmentado para hibridização utilizando-se o *Kit CodeLink Expression Assay Reagent Manual Prep* (GE Healthcare). Para cada lâmina foram diluídos 10 µg dos cRNA alvo em 20 µL de água Milli-Q livre de DNase/RNase, em seguida foram adicionados 5 µL do tampão de fragmentação Tris-acetato 40mM pH 7,9 (100 mM KOAc, 31,5 mM MgOAc). A mistura foi aquecida por 20 min a 94 °C e resfriada em gelo por 5 min. Esse produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo para verificar se realmente ocorreu fragmentação. O cRNA fragmentado deve apresentar tamanho entre 100 a 200 bases. A Figura 6 demonstra a fragmentação das seis amostras de cRNA .

M: marcador de peso molecular 50 pb
1 a 3: cRNA fragmentado (tecido normal)
4 a 6: cRNA fragmentado (cirrose)
pl: plasmídeo pTRI-Xef 1 (controle da transcrição *in vitro*)

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% demonstrando a fragmentação do cRNA marcado com biotina e purificado, assegurando a boa qualidade das sondas.

3.2.7.3 Preparação das soluções para reação de hibridização

Para cada lâmina processada, foi preparada uma mistura de hibridização em um tubo de microcentrífuga contendo 10 µg do cRNA fragmentado como se segue:

Componente A do tampão de hibridização	78 µL
Componente B do tampão de hibridização	130 µL
Água Milli-Q livre de DNase/RNase	27 µL
cRNA fragmentado	25 µL

A solução de hibridização acima foi incubada a 90 °C por 5 min para denaturar o cRNA.

3.2.8 Hibridização das lâminas

Para cada lâmina, foram pipetados 250 µL da solução de hibridização. Posicionou-se a ponteira da micropipeta sobre orifício apropriado da lâmina e injetou-se a solução de hibridização lentamente para não haver formação de bolhas no interior da câmara. Após o carregamento, as câmaras de hibridização foram seladas com adesivos para prevenir evaporação. Em seguida, as lâminas foram colocadas em bandeja própria em agitador (*Innova 4080 Shaking Incubator – New Brunswick Scientific, Edison, EUA*) e mantidas a 37 °C sob agitação a 300 rpm por 18 h.

3.2.9 Processamento pós-hibridização

Para lavagem das lâminas após a hibridização, foram preparados os seguintes tampões:

Tampão TNT 1X (1 litro)

Tris HCl 1M pH 7,6	100 mL
NaCl 5M	30 mL
<i>Tween</i> 20	0,5 mL
Água Milli-Q qsp	1000 mL

Tampão TNT 0,75X (500 mL)

Tris HCl 1M pH 7,6	37,5 mL
NaCl 5M	11,25 mL
<i>Tween</i> 20	0,19 mL
Água Milli-Q qsp	500 mL

As duas soluções acima foram filtradas em filtro de 0,2 μm (*Nalgene*) com bomba de vácuo e transferidas para frascos âmbar autoclavados.

Tampão SSC 0,1X /0,05% *Tween* 20 (250 mL)

SSC 20X	1,25 mL
<i>Tween</i> 20	0,125 mL
Água Milli-Q qsp	250 mL

A solução foi transferida para frasco autoclavado.

Tampão TNB (100mL)

Tris HCl pH 7,6 1M	10 mL
NaCl 5M	3 mL
Água Milli-Q qsp	100 mL

A solução acima foi aquecida a 60 °C para posterior adição do reagente bloqueador NEN (*Perkin-Elmer*, PE) na concentração final de 0,5% e filtrada a quente através de filtro de 0,88 µm com bomba de vácuo.

Solução de uso de estreptavidina 1:500

Adicionou-se 1mL de água Milli-Q livre de DNase/RNase ao frasco contendo 1mg de Cy5-estreptavidina liofilizada. Homogenizou-se a solução e colocou-se no gelo por 5 min protegida da luz. Fizeram-se alíquotas de 90µL em tubos de 0,5mL. Esta solução pode ser estocada em freezer -20 °C por seis meses. Para a solução de uso (1:500), adicionou-se 6,8µL da solução estoque em 3,4 mL de tampão TNB previamente filtrado para cada lâmina a ser processada.

3.2.10 Procedimento para lavagem das lâminas de microarranjos

Após o período de 18 h, as lâminas foram removidas do agitador, e colocadas em um aparato de lâminas previamente preenchido com 13 mL de tampão TNT 0,75X filtrado e incubadas a 46 °C por 1 h. Após o período de uma hora, o aparato plástico contendo as lâminas foi removido e colocado

em outro reservatório, com individualização de câmaras, contendo 3,4 mL do conjugado cianina-5-estreptavidina (*Cy5–Streptavidin conjugate*, GE Healthcare) para cada lâmina, incubados por 30 min a temperatura ambiente protegido da luz.

A seguir, as lâminas foram lavadas por 5 min seqüencialmente em quatro aparatos plásticos contendo 240 mL de tampão TNT 1X para remover qualquer conjugado não ligado. Após a quarta lavagem, as lâminas foram colocadas em outro recipiente contendo 240 mL de 0,05% *Tween* 20/SSC por 30 s. Em seguida, as lâminas foram secas por centrifugação a 2.000 rpm por 3 min em centrífuga refrigerada (*Eppendorf*), usando-se rotor apropriado para placas (*swinging bucket rotor*) para completa secagem das lâminas.

3.2.11 Leitura das lâminas de microarranjos

O *GenePix 4000B Array Scanner* (Axon Instruments, Union City, EUA) foi utilizado para capturar as imagens, este *scanner* localiza os pontos de hibridização e adquire os dados correspondentes aos sinais de fluorescência emitidos pelo material presente na lâmina de hibridização, quando o fluoróforo cianina-5 é excitado pelo laser emitido pelo sistema. O sistema permite a quantificação do sinal desde que a luz emitida pelo fluorocromo excitado seja convertida em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável, que é proporcional ao número de fótons detectados.

A intensidade dos sinais de fluorescência foi analisada com o auxílio do programa *CodeLink Expression Array* (GE Healthcare Bio-Sciences),

ajustado para comprimento de onda em 635 nm, tubo fotomultiplicador com voltagem de 600V, potência do Laser 100% e resolução do *scanner* em 10 μ (Figura 7). Os valores de expressão foram normalizados pela mediana dos valores de todos os genes da plataforma, e os resultados exportados para planilhas do *software Microsoft Excel*.

Figura 7. *Software CodeLink Expression Analysis* onde foram analisadas as imagens capturadas pelo *scanner*, em detalhe a ampliação de dois *spots*.

3.3 Análise do perfil de expressão gênica por microarranjos

Após aquisição das imagens das lâminas, obtém-se uma gama de informações fornecidas pelo programa *CodeLink™ Expression Array Software* (GE Healthcare Biosciences). Inicialmente, os dados são analisados quanto à reprodutibilidade das lâminas por meio do coeficiente de variação logo após a normalização, objetivando excluir variações ocorridas durante a técnica de microarranjo.

A coleção de genes diferencialmente expressos foi particionada em subconjuntos pela técnica de agrupamento hierárquico. Os grupos são formados de modo que as distâncias entre os elementos de um grupo sejam mínimas e as distâncias entre os grupos sejam máximas. O agrupamento hierárquico, portanto, procura classificar num mesmo subgrupo as amostras ou elementos semelhantes por grau de similaridade, que resulta em gráfico denominado dendograma.

O sistema de análise de dados de microarranjos *GeneSifter™* (VizX Labs LLC, Seattle, WA, USA; <http://www.genesifter.net>) foi utilizado para a análise dos dados gerados pela comparação entre o grupo controle (tecido hepático normal) e o grupo de cirrose secundária a EHNA. Um sistema que realiza busca *on-line* no banco de dados *Gene Ontology Consortium-GO* (<http://www.geneontology.org/GO.doc.html>) e em um banco de dados público que reúne genes, genomas e vias metabólicas [*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)] (<http://www.systems-biology.org/001/001.html>), o qual disponibiliza um vocabulário controlado para descrever cada gene e o produto do gene para qualquer organismo.

A classificação funcional dos genes e das vias metabólicas nas quais eles estão envolvidos, associados aos genes diferencialmente expressos, foi examinada utilizando-se um *z-score* estabelecido. O *z-score* resultou da divisão da diferença do número de genes observados de acordo com os critérios em uma condição específica do GO e do número de genes esperados baseado no número total dos genes no microarranjo de acordo com os critérios e padronizações pela divisão do desvio padrão do número observado dos genes sob a distribuição hipergeométrica.

$$\mathbf{z\text{-}score = (k - np) / \sqrt{np \times (1 - p)}}$$

k: nº de genes DE em uma determinada via metabólica

n: nº de genes na via metabólica

p: proporção esperada de genes DE na via metabólica

sqrt: raiz quadrada

Um *z-score* positivo indica que mais genes do que o esperado preencheu o critério em um determinado grupo ou via; portanto, esse grupo ou via provavelmente apresentam genes diferencialmente expressos. Os parâmetros utilizados para identificar os genes expressos diferencialmente usando o *GeneSifter*TM foram: normalização pela mediana; teste T de *Student's* (bicaudado, não pareado); qualidade = 1; limite de corte = 2,0 e transformação logarítmica.

3.4 Arranjo em matriz tecidual

O arranjo em matriz tecidual (do inglês, *tissue microarray*- TMA) constitui um método que redistribui numerosos fragmentos cilíndricos teciduais de blocos de parafina convencionais (blocos doadores) em um novo bloco (bloco receptor). Este bloco compartimentalizado contém as várias amostras teciduais seguindo uma ordem pré-determinada, permitindo assim o estudo da expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, de tempo e de custos (Kononen, 1998).

Foram selecionados 47 casos de cirroses de diferentes etiologias, dentre elas, secundária a EHNA, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, por vírus C, por vírus B, hepatite autoimune, deficiência de α -1 antitripsina, por consumo de álcool, doença de Wilson e criptogênica (Gráfico 1) e também 12 amostras de fígado normal para um segundo TMA, no período de 2003 a 2007, provenientes da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Gráfico 1. Representação gráfica das diferentes etiologias de cirrose hepática utilizadas na confecção do TMA (T 0157) para avaliação imunohistoquímica

Cortes histológicos representativos dos casos, corados por hematoxilina e eosina (HE) foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores (1 a 2 cilindros por caso) foram transportados para os blocos de parafina receptores através de um sistema mecanizado de precisão (*Beecher Instruments, Silver Springs, MD, EUA*), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definida num sistema cartesiano de coordenadas. No total, foram construídos 3 TMAs diferentes com 1 a 2 amostras dos 47 casos de cirrose hepática e dos 12 fígados normais. Na Figura 8 estão ilustradas as fotos panorâmicas de dois TMAs confeccionados para as análises imunohistoquímicas.

Figura 8. Vista panorâmica dos cortes histológicos dos blocos de TMA designados T0029 (A) contendo amostras de fígado normal e T0157 (B) contendo amostras de cirroses de diferentes etiologias (Coloração HE).

3.5 Técnica Imunohistoquímica

A pesquisa imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia Hepática (LIM-14), da FMUSP, sendo avaliada por dois observadores conjuntamente, sem conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes constantes da lâmina de TMA.

Foi escolhido um conjunto de três lâminas para cada um dos marcadores examinados. O método imuno-histoquímico utilizado foi de imuno-peroxidase com recuperação antigênica pelo calor úmido (Shi, 1991). Resumidamente, a técnica consistiu em desparafinização e hidratação das lâminas contendo os cortes histológicos dos blocos de TMA. Foi então realizada recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM pH 6,0 para os anticorpos anti-4EBP-1 (clone 53H11), anti-phospho-4EBP-1 (Thr37/46, clone 236B4), anti-mTOR (clone 7C10) e anti-phospho-mTOR (Ser2448, clone 49F9) e com EDTA 1 mM pH 8,0 para o anticorpo anti-mTOR (7C10), em panela a vapor por 40 min a 95 °C.

Após lavagens em água corrente, água destilada e PBS pH 7,4, seguiu-se etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual com peróxido de hidrogênio a 6% (20 volumes) diluído v/v em metanol, em três banhos de 10 min cada. Após nova lavagem em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4, realizou-se bloqueio inespecífico de carga com *CASBlock™* (Invitrogen/Zymed) por 10 min a 37 °C. Após a retirada do excesso, as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, em título definido previamente no laboratório

(Tabela 4), diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS pH 7,4, em câmara úmida por 30 min a 37°C e, em seguida por 18 horas (*over-night*) a 4°C.

Em um conjunto extra de três lâminas omitiram-se os anticorpos primários, permanecendo as lâminas em incubação com PBS pH 7,4 com soroalbumina bovina 1% e Na₃N 0,1%, servindo como controles negativos. Como controles positivos utilizaram-se amostras de adenocarcinoma gástrico e placenta (Figuras 9 e 10).

Após 3 lavagens em PBS pH 7,4, seguiu-se incubação com o sistema secundário *Novolink* (*Vision Biosystems*™, EUA) de tipo polímero curto acoplado a peroxidase, por 30 min a 37 °C. Após novas lavagens em PBS pH 7,4, realizou-se revelação com o substrato enzimático 3,3'-diaminobenzidina-DAB (Sigma) a 60 mg % em PBS pH 7,4 por 5 min a 37 °C, seguindo-se lavagens em PBS pH 7,4, água corrente, água destilada e contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 min em temperatura ambiente, seguida da desidratação em cadeia ascendente de álcoois e xilol com posterior montagem das lâminas com resina sintética *Entellan* (*Merck*, Alemanha).

Figura 9. Controle positivo das proteínas 4EBP-1 (A) e 4EBP-1 fosforilado (B), onde observamos forte imunexpressão citoplasmática e nuclear em cerca de 60% das células neoplásicas (adenocarcinoma gástrico) com relação ao 4ebp-1 e moderada imunexpressão citoplasmática em cerca de 40% das células neoplásicas com relação ao 4ebp-1 fosforilado. Aumento de 40X.

Figura 10. Controle positivo das proteínas mTOR (A) e mTOR fosforilado (B) (placenta), onde observamos imunexpressão citoplasmática moderada a forte em todas as células do trofoblasto para ambas as proteínas. Especialmente quanto ao mTOR, observa-se fraca imunomarcagem em algumas células do estroma vilositário. Aumento de 40X.

3.6 Interpretação dos resultados imunohistoquímicos

Foi realizada uma avaliação da quantidade de hepatócitos imunoreativos onde, em cada cilindro amostral de cada lâmina com as reações imunohistoquímicas, foram avaliados os compartimentos celulares relevantes para cada anticorpo (Tabela 4), utilizando-se as faixas numéricas percentuais abaixo descritas de acordo com a porcentagem de hepatócitos imuno-expressando o antígeno:

0 = 0 %

10 = 1-10 %

20 = 11-20 %

30 = 21-30 %

40 = 31-40 %

50 = 41-50 %

60 = 51-60 %

70 = 61-70 %

80 = 71-80 %

90 = 81-90 %

100 = 91-100 %

Para a avaliação da intensidade da imunomarcacão utilizaram-se os valores de zero (ausente), 1 (fraca), 2 (média) e 3 (forte). A partir dos resultados da avaliação semi-quantitativa da quantidade de hepatócitos imunoreativos e dos resultados da avaliação de intensidade da

imunomarcação, foi calculado um escore através da multiplicação dos valores das duas avaliações (quantidade *versus* intensidade), o qual variou entre zero e 300. Quando um caso estava representado por dois cilindros, a média dos escores de cada cilindro foi utilizada para as análises estatísticas. Somente *spots* com pelo menos 50% de tecido de interesse (hepatócito) foram considerados.

Tabela 4. Anticorpos monoclonais utilizados nas reações de imunohistoquímica, bem como seus clones, diluições e fornecedor

Anticorpo	Origem	Fornecedor	Título Diluição	Imunolocalização celular
Anti-4E-BP1 (53H11)	coelho monoclonal	<i>Cell Signaling</i>	1:300	citoplasma e/ou núcleo (avaliados em bloco)
Anti-phospho- 4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)	coelho monoclonal	<i>Cell Signaling</i>	1:200	citoplasma e/ou núcleo (avaliados em bloco)
Anti-mTOR (7C10)	coelho monoclonal	<i>Cell Signaling</i>	1:50	citoplasma
Anti-phospho- mTOR (Ser2448) (49F9)	coelho monoclonal	<i>Cell Signaling</i>	1:50	citoplasma, membrana

3.7 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa de estatística *GraphPad Prism* versão 4.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA). Para a comparação dos dados imunohistoquímicos, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando o valor de p era significativo, foram realizadas comparações múltiplas para avaliação das diferenças intergrupos pelo teste de Dunn. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4.

RESULTADOS

4.1 Análise dos genes diferencialmente expressos e vias metabólicas moduladas

Foram identificados 244 genes diferencialmente expressos no tecido hepático de pacientes com diagnóstico de cirrose hepática secundária a EHNA, dos quais 138 genes com expressão aumentada e 106 genes com expressão diminuída quando comparados ao tecido hepático normal com significância ($p < 0,05$), segundo o teste t de *Student's* (taxa $\log_2$ de expressão gênica individual) e *Fold Change* ($FC > 2$). O *fold change* é o valor que possibilita a comparação linear das razões entre as intensidades comparadas, ou seja, quanto maior o módulo, mais diferencialmente expresso estará o gene.

O dendograma representado na Figura 11 ilustra o agrupamento hierárquico não supervisionado de amostras de tecido hepático normal e tecido hepático cirrótico, segundo o perfil de expressão gênica dos 244 genes diferencialmente expressos. Pelo dendograma nota-se, claramente, a separação dos indivíduos de acordo com a situação funcional estudada, ou seja, amostras de fígado normal e tecido cirrótico, indicando uma similaridade no perfil de expressão gênica dos pacientes portadores de cirrose secundária a EHNA.

A partir da análise pelo *Gene Ontology* foram identificadas nove vias metabólicas contendo 68 genes não redundantes (um gene pode pertencer a várias categorias), com significância estatística, possivelmente envolvidas na etiopatogênese da cirrose secundária a EHNA. As vias com regulação diminuída na cirrose secundária a EHNA em comparação ao fígado normal foram: biosíntese de esteróides, sistema de sinalização do fosfatidilinositol, metabolismo da pirimidina e a via de sinalização do mTOR, com *z-score* de 9,11; 3,09; 2,68 e 2,17 respectivamente. Em relação às vias com expressão aumentada encontramos: sinalização do receptor de células T, interação matriz extracelular-receptor, interação receptor citocina-citocina, regulação da actina do citoesqueleto e cascatas da coagulação e do complemento *z-score* de 2,94; 2,51; 2,39; 2,37 e 2,1 respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7).

Figura 11. Dendrograma representando o agrupamento hierárquico de amostras de tecido hepático cirrótico e tecido hepático normal segundo o perfil de expressão gênica dos 244 genes diferencialmente expressos. As intensidades de cada *spot* em cada amostra foram normalizadas pelo *z-score*. A escala de cores reflete o número de desvios-padrão em relação à intensidade média de cada *spot* em todas as amostras. O dendrograma de barras verticais mostra o agrupamento inter-amostral e o dendrograma de barras horizontais mostra o agrupamento intra-amostral dos genes.

Tabela 5. Vias com genes diferencialmente expressos segundo análise pelo banco de dados *Gene Ontology Consortium* (GO)

VIAS METABÓLICAS	Genes EHNA/Cir				z-score ≥2,0
	nºgenes DE	up	down	array	
<i>T cell receptor signaling pathway</i>	10	5	5	100	2,94
<i>ECM-receptor interaction</i>	6	4	2	84	2,51
<i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i>	11	8	3	244	2,39
<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	15	8	7	203	2,37
<i>Complement and coagulation cascades</i>	7	4	3	65	2,1
<i>Biosynthesis of steroids</i>	7	0	7	17	9,11
<i>Phosphatidylinositol signaling system</i>	11	3	8	94	3,09
<i>Pyrimidine metabolism</i>	7	0	7	88	2,68
<i>mTOR signaling pathway</i>	5	1	4	47	2,17

DE: diferencialmente expresso; *up*: expressão aumentada; *down*: expressão diminuída; *array*: nº de genes contidos no microarranjo de cDNA

Tabela 6. Vias moduladas com expressão aumentada na cirrose hepática secundária a EHNA em comparação ao tecido hepático normal

UNIGENE	GENE	VIA METABÓLICA	DESCRIÇÃO	EHNA/Cir
		z-score		Fold Change
T cell receptor signaling pathway		2,94		
Hs.466907	CBLC		Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence c	down
Hs.591629	CD28		CD28 antigen (Tp44)	up
Hs.558348	ITK		IL2-inducible T-cell kinase	up
Hs.193717	IL10		Interleukin 10	down
Hs.390616	PAK3		p21 (CDKN1A)-activated kinase 3	up
Hs.497487	PIK3C2B		Phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide	down
Hs.371344	PIK3R2		Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	down
Hs.591127	RASGRP1		RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	up
Hs.32942	PIK3CG		Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	up
Hs.198998	CHUK		Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	down
ECM-receptor interaction		2,51		
Hs.213861	LAMA4		Laminin, alpha 4	up
Hs.17441	COL4A1		Collagen, type IV, alpha 1	up
Hs.508010	FNDC3A		Fibronectin type III domain containing 3	down
Hs.72550	HMMR		Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	down
Hs.520525	FNDC1		Fibronectin type III domain containing 1	up
Hs.591484	LAMC2		Laminin, gamma 2	up
Cytokine-cytokine receptor interaction		2,39		
Hs.73853	BMP2		Bone morphogenetic protein 2	up
Hs.546294	CCL17		Chemokine (C-C motif) ligand 17	up
Hs.514821	CCL5		Chemokine (C-C motif) ligand 5	up
Hs.34526	CXCR6		Chemokine (C-X-C motif) receptor 6	up
Hs.507590	FLT3		Fms-related tyrosine kinase 3	up
Hs.193717	IL10		Interleukin 10	down
Hs.591742	IL7R		Interleukin 7 receptor	up
Hs.624	IL8		Interleukin 8	up
Hs.846	IL8RB		Interleukin 8 receptor, beta	down
Hs.78781	VEGFB		Vascular endothelial growth factor B	down
Hs.488293	EGFR		Epidermal growth factor receptor	up
Regulation of actin cytoskeleton		2,37		
Hs.525572	BDKRB1		Bradykinin receptor B1	up
Hs.525572	BDKRB2		Bradykinin receptor B2	up
Hs.479747	BCAR1		Breast cancer anti-estrogen resistance 1	down
Hs.287370	FGF23		Fibroblast growth factor 23	up
Hs.522373	GSN		Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	up
Hs.199763	SSH1		Slingshot homolog 1 (Drosophila)	up
Hs.410092	F2		Coagulation factor II (thrombin)	down
Hs.431850	MAPK1		Mitogen-activated protein kinase 1	down
Hs.390616	PAK3		p21 (CDKN1A)-activated kinase 3	up
Hs.497487	PIK3C2B		Phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide	down
Hs.371344	PIK3R2		Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	down
Hs.517228	TIAM1		T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	down
Hs.534371	PIP5K1B		Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	down
Hs.32942	PIK3CG		Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	up
Hs.488293	EGFR		Epidermal growth factor receptor	up
Complement and coagulation cascades		2,10		
Hs.525572	BDKRB1		Bradykinin receptor B1	up
Hs.525572	BDKRB2		Bradykinin receptor B2	up
Hs.1321	F12		Coagulation factor XII (Hageman factor)	up
Hs.481992	C6		Complement component 6	down
Hs.93210	C8A		Complement component 8, alpha polypeptide	down
Hs.410092	F2		Coagulation factor II (thrombin)	down
Hs.516578	TFPI		Tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	up

Fold Change (FC): up ($FC \geq 2,0$); down ($FC \leq 2,0$)

Up: expressão aumentada; **down:** expressão diminuída

Tabela 7. Vias moduladas com expressão diminuída na cirrose hepática secundária a EHNA em comparação ao tecido hepático normal

UNIGENE	GENE	VIA METABÓLICA		DESCRIÇÃO	EHNA/Cir
		z-score			Fold Change
Biosynthesis of steroids		9,11			
Hs.503134	DHCR7			7-dehydrocholesterol reductase	down
Hs.632801	EBP			Emopamil binding protein (sterol isomerase)	down
Hs.643476	FDFT1			Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	down
Hs.283652	IDI1			Isopentenyl-diphosphate delta isomerase	down
Hs.130607	MVK			Mevalonate kinase (mevalonic aciduria)	down
Hs.71465	SQLE			Squalene epoxidase	down
Hs.287749	SC5DL			Sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, fungal)-like	down
Phosphatidylinositol signaling system		3,09			
Hs.235116	GRK6			G protein-coupled receptor kinase 6	down
Hs.431173	PLCB1			Phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	up
Hs.580527	INPP4A			Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type I	down
Hs.523360	INPP5A			Inositol polyphosphate-5-phosphatase	down
Hs.397465	HIPK2			Homeodomain interacting protein kinase 2	down
Hs.497487	PIK3C2B			Phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide	down
Hs.371344	PIK3R2			Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	down
Hs.498892	EEF2K			Eukaryotic elongation factor-2 kinase	down
Hs.534371	PIP5K1B			Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	down
Hs.32942	PIK3CG			Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	up
Hs.472027	CDS2			CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	up
Pyrimidine metabolism		2,68			
Hs.473087	CTPS			Cytidine 5'-triphosphate synthetase	down
Hs.599355	DTYMK			Deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	down
Hs.567352	TXNRD1			Thioredoxin reductase 1	down
Hs.458360	UCK2			Uridine-cytidine kinase 2	down
Hs.591457	POLR3C			Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C	down
Hs.515122	TK1			Thymidine kinase 1	down
Hs.643610	POLR3H			Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H	down
mTOR signaling pathway		2,17			
Hs.411641	EIF4EBP1			Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	down
Hs.431850	MAPK1			Mitogen-activated protein kinase 1	down
Hs.371344	PIK3R2			Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	down
Hs.32942	PIK3CG			Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	up
Hs.78781	VEGFB			Vascular endothelial growth factor B	down

Fold Change (FC): up ($FC \geq 2,0$); down ($FC \leq 2,0$)

Up: expressão aumentada; **down:** expressão diminuída

4.2 Resultados da análise imunohistoquímica

Considerando-se que os experimentos de microarranjo mensuram somente a quantidade de mRNA (transcrição gênica) produzido e que isso não necessariamente implica na expressão protéica (síntese protéica), resultado da tradução do mRNA dos genes, utilizamos a marcação das proteínas por reações de imunohistoquímica.

A análise qualitativa dos resultados demonstrou 100% de imunorreatividade (coloração positiva para a proteína de interesse) na expressão da proteína 4EBP-1 nas amostras de fígado normal, 90% nas amostras de cirrose secundária a EHNA e 57% no grupo de cirroses de outras etiologias. Para a forma fosforilada de 4EBP-1, encontramos 92% de imunorreatividade em fígado normal, 70% na cirrose secundária a EHNA e 46% nas cirroses de outras etiologias. Quanto à proteína mTOR, obtivemos imunorreatividade de 91% em fígado normal, 70% na na cirrose secundária a EHNA e 100% nas cirroses de outras etiologias. Sua forma fosforilada apresentou coloração no citoplasma e na membrana. No citoplasma, apenas 33% de imunorreatividade no fígado normal, 80% na cirrose secundária a EHNA e 38% nas cirroses de outras etiologias. Quanto à membrana, os resultados foram de 42% em fígado normal, 80% na cirrose secundária a EHNA e de apenas 32% nas outras cirroses (Tabela 8).

Tabela 8. Análise imunohistoquímica qualitativa referente à imunorreatividade das proteínas estudadas

	4EBP-1	4EBP-1 fosforilado	mTOR	mTOR fosforilado (citoplasma)	mTOR fosforilado (membrana)
Fígado normal (n=12)	12/12	11/12	10/11	4/12	5/12
	100%	92%	91%	33%	42%
EHNA/Cir (n=10)	9/10	7/10	7/10	8/10	8/10
	90%	70%	70%	80%	80%
Outras cirroses (n=37)	21/37	17/37	37/37	14/37	12/37
	57%	46%	100%	38%	32%

Na tabela 9 estão descritos os valores referentes às médias e erro-padrão das médias dos escores (quantidade *versus* intensidade) para cada uma das proteínas estudadas, assim como suas formas fosforiladas, obtidos após a análise estatística.

Tabela 9. Médias dos valores referentes aos escores imunohistoquímicos para cada uma das proteínas estudadas nos respectivos TMAs (média $\pm$ erro padrão)

	4EBP-1	4EBP-1 fosforilado	mTOR	mTOR fosforilado (citoplasma)	mTOR fosforilado (membrana)
Fígado normal	130,0 $\pm$ 15,6 &	125,8 $\pm$ 22,6#	118,2 $\pm$ 18,2 &	3,7 $\pm$ 1,8 &	6,25 $\pm$ 2,8
EHNA/Cir	113,5 $\pm$ 24,1#	86,5 $\pm$ 26,3	112,0 $\pm$ 31,4 α	35,0 $\pm$ 16,6#	24,5 $\pm$ 11,2 α
Outras cirroses	27,4 $\pm$ 5,9 & #	30,1 $\pm$ 8,2#	184,2 $\pm$ 6,0& α	10,1 $\pm$ 4,5 & #	4,9 $\pm$ 1,6 α

& $p < 0,001$ # $p < 0,01$ α $p < 0,05$

Apesar da via de sinalização do mTOR e o gene EIF4EBP-1 estarem com regulação diminuída na cirrose secundária a EHNA comparada ao fígado normal nos experimentos de microarranjo, a análise imunohistoquímica da proteína 4EBP-1 mostrou aumento significativo no fígado normal comparado às cirroses de outras etiologias ($p < 0,001$), assim como na comparação de EHNA/Cir e outras cirroses ($p < 0,01$), porém sem diferença entre fígado normal e EHNA/Cir (Figura 12). Quando analisamos a forma fosforilada de 4EBP-1, detectamos aumento significativo apenas entre o fígado normal e cirroses de outras etiologias ($p < 0,01$) (Figura 13).

Quanto à análise imunohistoquímica de mTOR, encontramos expressão significativamente aumentada nas cirroses de outras etiologias

quando comparadas a EHNA/Cir e fígado normal ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente) (Figura 14). Com relação ao mTOR fosforilado, houve aumento significativo da expressão na EHNA/Cir quando comparado às cirroses de outras etiologias, tanto no citoplasma quanto na membrana ($p<0,05$) (Figura 15).

Figura 12. Imunoexpressão citoplasmática/nuclear de 4EBP-1 no fígado normal (A), na EHNA/Cir (B) e na cirrose por vírus C (C), com escores de 100 (quantidade 100 x intensidade 1), 200 (100x2) e zero (0x0), respectivamente. Aumentos de 10X (A, B e C) e 40X (D, E e F).

Gráfico 2. Representação gráfica das médias do escore imunohistoquímico (quantidade *versus* intensidade) para 4EBP-1 (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

Figura 13. Imunoexpressão citoplasmática/nuclear de 4EBP-1 fosforilado no fígado normal (A), na EHNA/Cir (B) e na cirrose por vírus C (C), com escores de 100 (quantidade 100 x intensidade 1), 200 (100x2) e zero (0x0), respectivamente. Aumentos de 10X (A, B e C) e 40X (D, E e F).

Gráfico 3. Representação gráfica das médias do escore imunohistoquímico (quantidade *versus* intensidade) para 4EBP-1 fosforilado (* $p < 0,001$)

Figura 14. Imunoexpressão citoplasmática de mTOR no fígado normal (A), na EHNA/Cir (B) e na cirrose por vírus C (C), com escores de 100 (quantidade 100 x intensidade 1), 300 (100x3) e 200 (100x2), respectivamente. Aumentos de 10X (A, B e C) e 40X (D, E e F).

Gráfico 4. Representação gráfica das médias do escore imunohistoquímico (quantidade *versus* intensidade) para mTOR (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Figura 15. Imunoexpressão citoplasmática/membrana de mTOR fosforilado no fígado normal (A), na EHNA/Cir (B) e na cirrose por vírus C (C), com escores de zero (quantidade 0 x intensidade 0), 20 (20x1) e zero (0x0), respectivamente. Aumentos de 10X (A, B e C) e 40X (D, E e F).

Gráfico 5 (A e B). Representação gráfica das médias do escore imunohistoquímico (quantidade *versus* intensidade) para mTOR fosforilado (imunoreatividade no citoplasma e na membrana) * $p < 0,05$

Gráfico 6 (A e B). Representação gráfica das médias do escore imunohistoquímico (quantidade *versus* intensidade) para 4EBP-1 (A) e 4EBP-1 fosforilado (B) entre fígado normal e todas as cirroses agrupadas.

A **B**

5.

DISCUSSÃO

A DHGNA é considerada atualmente uma epidemia mundial, representando a forma mais comum de doença hepática com potencial evolutivo para EHNA, fibrose, cirrose e finalmente, carcinoma hepatocelular em pacientes sem história de etilismo crônico.

Resumidamente, a patogênese da EHNA caracteriza-se por aumento do depósito de lipídios no fígado em decorrência de resistência à insulina. Posteriormente, o estresse oxidativo, devido ao desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, favorece um aumento da peroxidação lipídica, ativação das células hepáticas estreladas e um padrão anormal de produção de citocinas, levando à lesão celular e à fibrose (Chitturi, 2001; Videla, 2004). Embora estas vias estejam reconhecidamente envolvidas na patogênese da EHNA, não se conhece, no entanto, o mecanismo íntimo destes processos.

A determinação dos genes possivelmente envolvidos na fisiopatologia pode ser útil não só na identificação de marcadores da doença como de possíveis alvos terapêuticos. Com o objetivo de determinarmos o perfil de expressão gênica de amostras de cirrose secundária a EHNA comparando-as ao tecido hepático normal, optamos pela utilização de plataforma comercial de microarranjos de oligonucleotídeos contendo aproximadamente 55.000 transcritos. Esta plataforma conta com sofisticado sistema de controle de qualidade na fabricação, e com ótimo perfil de sensibilidade e

especificidade, conforme demonstrado em estudos independentes (Ramakrishnan, 2002; Doris, 2003; Tan, 2003; Yauk, 2004).

Em nosso estudo identificamos as seguintes vias com regulação diminuída na cirrose secundária a EHNA em comparação ao fígado normal: biosíntese de esteróides, sistema de sinalização do fosfatidilinositol, metabolismo da pirimidina e a via de sinalização do mTOR. Em relação às vias com expressão aumentada encontramos: sinalização do receptor de células T, interação matriz extracelular-receptor, interação receptor citocina-citocina, regulação da actina do citoesqueleto e cascatas da coagulação e do complemento.

A utilização e metabolismo aumentados de nucleotídeos de purina e pirimidina têm sido descritos após hepatectomia parcial ou lesão hepática, indicando a necessidade de síntese de nucleotídeos durante o processo de regeneração (Usami, 1997). A expressão diminuída desta via na cirrose secundária a EHNA está em concordância com achados prévios de Hashimoto et al. (1998), que relataram diminuída síntese de DNA em pacientes cirróticos e também em animais submetidos à cirurgia hepática, provavelmente representando uma alteração relacionada ao estágio final da doença hepática e não necessariamente associada a EHNA.

Por outro lado, a regulação diminuída de diversos genes pertencentes à via de biossíntese de esteróides, incluindo quatro dos sete genes aqui identificados (DHCR7, FDFT1, IDI1 e MVK) pode ser importante na progressão da DHGNA. Estes genes foram previamente descritos em hepatócitos de ratos expostos à privação de arginina e os

pesquisadores interpretaram este dado como estresse do retículo endoplasmático (Leong, 2006).

Em outro estudo experimental, foi também demonstrado que o estresse crônico do retículo endoplasmático está presente em tecido hepático de modelos experimentais com dieta hiperlipídica e em camundongos obesos (ob/ob) geneticamente modificados, sendo capaz de interferir na sinalização do receptor de insulina, inibindo sua ação nas células hepáticas e ainda, promovendo a ativação de mecanismos apoptóticos (Ozcan, 2004). Além disso, o estresse do retículo endoplasmático parece ser uma importante ligação molecular entre obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2, o que torna plausível sua participação no desenvolvimento e progressão da DHGNA (Ji, 2006; Yang, 2007).

A regulação diminuída da via do mTOR foi um achado que nos despertou grande interesse, uma vez que existem evidências do envolvimento desta via de sinalização na ativação das células hepáticas estreladas e na fibrogênese (Neef, 2006).

A via do mTOR é reconhecida como um importante mediador de processos anabólicos, funcionando como uma via de tradução sensível à nutrientes e podendo interagir com outros sensores, que detectam alterações em nutrientes disponíveis, tais como as vias de sinalização de insulina e AMPK (5'AMP-*activated protein kinase*) (Marshall, 2006) (Figura 16).

Figura 16. Representação esquemática da via de sinalização do mTOR em células de mamíferos. As flechas representam ativação, as barras representam inibição e os pontos representam ligação. Adaptado de Yang, 2007.

Pertence à família dos fosfatidil-inositol quinases (PI3K), que também possui atividade de serina-treonina proteína quinase. O mTOR participa da ativação da p70S6K e, conseqüentemente, da biogênese de ribossomos, através da fosforilação da subunidade ribossomal S6, assim como promove a tradução de mensagens que contêm uma sequência de 7 a 14 pirimidinas justaposta à metionina de iniciação da tradução protéica. De maneira mais direta, o mTOR fosforila a proteína inibidora da iniciação de tradução protéica 4EBP-1, impedindo que este iniba o início da tradução protéica através do acoplamento com a extremidade *cap* dos RNAm. Este duplo efeito inibitório do mTOR promove a boa tradução protéica (Hay, 2004) (Figura 17).

Figura 17. Mecanismos de indução da tradução protéica pelo mTOR. O mTOR estimula a tradução protéica através de dois agentes efetores: a p70S6K e o 4EBP-1. A p70S6K atua na tradução de mRNA - contendo seqüências de oligo-pirimidinas na região 5' UTR adjacente ao CAP - e na fosforilação do polipeptídeo ribossômico S6 - pela proteína quinase p70S6K. Ambos os efeitos promovem o aumento da síntese protéica. Através da fosforilação inibitória de iniciação do 4EBP-1, o mTOR induz a tradução de mRNA com estruturas secundárias estáveis na porção 5' UTR. Modificado de hay & Sonenberg, 2004.

Estudos recentes mostram o envolvimento da via do mTOR no desenvolvimento da esteatose hepática e resistência à insulina seguidas de dieta com alto teor de gordura, sinalizando para o papel do mTOR na DHGNA (Khamzina, 2005; Korshennikova, 2006). Interessantemente, um dos genes reprimidos na via do mTOR em nosso estudo, eIF4EBP1, codifica uma proteína de ligação, a qual é um efetor final do mTOR, estando envolvido com resistência à insulina em modelos de camundongos com duplo *knock-out* para eIF4EBP1 e eIF4EBP2. O gene eIF4EBP1 leva à ativação de outro alvo também final, *S6K1*, o qual é capaz de fosforilar o substrato do receptor de insulina IRS-1 em resíduos de serina, e assim também inibir a sinalização de insulina (Le Bacquer, 2007).

Este achado motivou-nos a pesquisar a expressão protéica através das técnicas de micromatriz tecidual e imunohistoquímica das proteínas mTOR e 4EBP-1, assim como, suas formas fosforiladas para comparações dos achados entre cirrose secundária a EHNA e cirroses de outras etiologias. Esta abordagem tem o intuito de identificar possíveis marcadores específicos para a cirrose secundária a EHNA. Sabe-se que, a detecção da proteína, mais do que a simples presença do transcrito, é fundamental para o estudo da expressão das proteínas, em seu ambiente tecidual, e da função das células.

Em nossos resultados referentes à expressão gênica, apesar da via do mTOR apresentar-se com regulação diminuída na cirrose secundária a EHNA em relação ao fígado normal, a expressão do mTOR fosforilado foi significativamente maior na cirrose secundária a EHNA em comparação às

cirrozes de outras etiologias e também no fígado normal. A análise do mTOR total não demonstrou uma expressão aumentada na cirrose secundária a EHNA, a qual está de acordo com os dados de Sahin et al., os quais propuseram que o estudo apenas do mTOR total pode levar à perda de casos onde a via está ativada.

Dada a etiopatogênese da DHGNA, intimamente relacionada com sobrecarga de nutrientes e resistência à insulina, parece factível propor que a via do mTOR possa participar na patogênese da DHGNA até o estágio final da doença hepática e, indo mais além, que a sinalização desregulada de mTOR seja um evento mais geral, assim sugerido por Calvert et al. (2007), os quais identificaram membros da via AKT/mTOR sendo diferentemente fosforilados no tecido adiposo do omento de pacientes com forma não progressiva de DHGNA e em outros com EHNA. Estes resultados sugerem investigações futuras quanto à caracterização do papel do mTOR na progressão da DHGNA abrindo possibilidades de intervenção terapêutica.

Outro aspecto interessante que também merece estudos adicionais é a ausência de diferença na expressão de 4EBP-1 fosforilado entre cirrose secundária a EHNA e fígado normal, embora em valores numericamente menores. No entanto, houve diferença significativa entre fígado normal e cirrozes de outras etiologias (Gráfico 3). Uma possível explicação para esta dissociação é de que uma redução nos níveis celulares de ATP inibe a fosforilação de 4EPB-1 mTOR-dependente (Fingar, 2004). Foi demonstrada em modelos animais de cirrose hepática, uma diminuída razão ATP/ADP,

que provavelmente ocorra também em fígados cirróticos humanos (Harvey, 2000). Em favor desta hipótese, está o achado de expressão de 4EBP-1 fosforilado, significativamente mais baixa, nas amostras de cirroses de todas as etiologias, inclusive por EHNA, quando comparadas ao fígado normal (Gráficos 6 A e B).

Uma possível explicação das cirroses secundárias a EHNA aproximarem-se mais do fígado normal do que as cirroses de outras etiologias é a menor lesão na maquinaria metabólica do hepatócito na EHNA, quando comparada às outras cirroses, onde o mecanismo primário de doença é a lesão do hepatócito.

Postula-se que a esteatose nos pacientes infectados pelo genótipo 3 esteja relacionada ao efeito citotóxico direto do VHC. Em 2001, Moriya et al. demonstraram, em estudo experimental, que a proteína core do VHC induz esteatose em ratos transgênicos. A corroborar a ação deletéria do vírus, foi demonstrado que a esteatose nos pacientes com esse genótipo correlaciona-se com a carga viral. Outra evidência a favor de efeito citotóxico direto do VHC genótipo 3 é o fato de que, após tratamento e eliminação do vírus, há diminuição significativa da esteatose (Poynard, 2003). Isto mostra que o acúmulo de gordura no hepatócito pode ser a via final comum de uma série de lesões.

Quanto às vias de metabolização com regulação aumentada, considerando-se o papel central da ativação das células hepáticas estreladas na produção de receptores de matriz extracelular e fibrogênese, a identificação da via interação matriz extracelular-receptor com genes que

codificam laminina, colágeno tipo IV e fibronectina, desregulada na cirrose secundária a EHNA, era esperada e pode refletir o estágio final da doença hepática, independente de sua etiologia.

Diferentemente de Sreekumar et al. (2003), não identificamos genes associados à degradação de espécies reativas de oxigênio e manutenção da função mitocondrial. No entanto, nossos resultados corroboram os achados deste grupo, que mostram a modulação de genes envolvidos na síntese e vias de degradação protéica e de ativação de complemento, bem como genes envolvidos no metabolismo da glicose e de ácidos graxos.

Nossos resultados foram semelhantes aos achados de Taniai et al. (2006) apenas quanto ao remodelamento da matriz extracelular, evidenciando o papel da modulação desta via também no estágio final da doença hepática. Os autores identificaram 304 genes diferencialmente expressos no tecido hepático de pacientes com EHNA e grau de fibrose avançado, avaliando o perfil de expressão gênica em tecido hepático de pacientes com EHNA e grau avançado de fibrose (F3-F4) e de pacientes com EHNA e grau de fibrose leve e moderada (F0-F2). De acordo com a análise do banco de dados *Gene Ontology Consortium* (GO), vários genes estavam relacionados ao remodelamento da matriz extracelular, ao estresse oxidativo e a inibição da collagenase. Dada a função biológica destas moléculas, estes achados evidenciam atividade da collagenase e resposta ao estresse oxidativo prejudicadas, as quais exercem papel fundamental na progressão da EHNA. Por outro lado, a expressão bastante aumentada, maior que 10 vezes, de genes envolvidos no estresse oxidativo e na

apoptose de hepatócitos, parece ser um importante mecanismo para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular na DHGNA.

Sabe-se que o fígado tem várias células capazes de sintetizar e depositar os componentes da matriz extracelular (fibroblastos, miofibroblastos e até os próprios hepatócitos). A célula estrelada do fígado armazena gordura e vitamina A que, sob a ação de citocinas fibrogênicas, (TGF- β , TNF- α , PDGF e outras), se diferencia em fenótipo miofibroblástico altamente proliferativo, engajando-se na síntese ativa dos elementos da matriz (colágenos, em suas formas fibrilares, elastina e substâncias glicoconjugadas). Alterações funcionais na cirrose hepática incluem produção de quantidades aumentadas de matriz extracelular incluindo colágenos de tipo I, III e IV, fibronectina, laminina e proteoglicanos comparados ao fígado normal (Yang, 2006).

As transformações celulares que acompanham a ativação das células estreladas do fígado incluem modificações morfológicas, com a formação de proteínas do citoesqueleto, como a actina da musculatura lisa; a perda das reservas de vitamina A e o aumento no tamanho do retículo endoplasmático rugoso. Sob o aspecto metabólico, há maior síntese de DNA e importante proliferação celular. O padrão de expressão gênica também se modifica, com notável aumento na síntese dos colágenos tipos I e IV (Yang, 2006). Nossos dados reforçam estas alterações citadas, pois também encontramos expressão aumentada da via de interação receptor-matriz extracelular com os respectivos genes, laminina (alfa 4), colágeno tipo IV, fibronectina tipo III e laminina (gama 2) com regulação aumentada (Tabela 6). Todas estas

alterações levam à desestruturação da arquitetura hepática no fígado cirrótico pela formação de cicatrizes fibrosas, nódulos de regeneração e hipertensão portal (Friedman, 2003; Parsons, 2007).

Outro estudo recente descreveu o perfil simultâneo de expressão gênica e proteômica em 98 indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica, os quais apresentam um completo espectro da DHGNA. Os autores encontraram expressão diferencial em 22 genes no tecido hepático proveniente de pacientes com DHGNA quando comparados aos controles obesos, dentre estes, genes relacionados à ativação de células estreladas do fígado e fibrogênese e ainda, 12 picos de proteínas significativamente alteradas em sua expressão. Vários genes foram diferencialmente expressos nos distintos estágios consecutivos de progressão da DHGNA (Younossi, 2005b).

Observamos regulação aumentada na via metabólica de interação receptor citocina-citocina na cirrose secundária a EHNA corroborando dados da literatura, onde diversos estudos tanto em animais e mais recentemente em pacientes portadores de EHNA, têm enfatizado que a alteração na produção de citocinas tem importante papel na patogênese desta doença. Atribui-se esta alteração no metabolismo das citocinas a quatro fatores principais: (a) função anormal dos macrófagos, (b) efeito do estresse oxidativo na translocação nuclear do fator de transcrição NFkB, (c) liberação direta de TNF- α pelo tecido adiposo e (d) crescimento bacteriano exacerbado no intestino delgado (Day, 2002; Diehl, 2005).

Das muitas citocinas envolvidas no processo inflamatório crônico da EHNA, o TNF- α tem atraído muita atenção. Sua expressão encontra-se

aumentada tanto no fígado quanto no tecido adiposo em pacientes com EHNA. Níveis do receptor solúvel de TNF encontram-se elevados tanto na esteatose quanto na esteatohepatite, assim como, monócitos circulantes de pacientes com EHNA têm secreção aumentada de TNF- α comparada a controles saudáveis (Abiru, 2006; Poniachik, 2006). A grande capacidade dos adipócitos, particularmente aqueles da gordura visceral, em secretar grandes quantidades de TNF- α fornece uma ligação entre obesidade e inflamação crônica (Diehl, 2005). O TNF- α mostra-se como citocina chave, na promoção da resistência à insulina (Sanyal, 2005).

Nossos resultados, em concordância com a literatura, mostram que a regulação aumentada de EGFR seja uma característica da cirrose. Fausto et al. (1995) sugeriram que a ativação do gene do fator de crescimento epidérmico (EGF) hepático constitui um mecanismo autócrino de regulação do crescimento pré-replicativo do hepatócito. Estes achados são consistentes com a noção de que, a expressão de EGF é um importante mecanismo regulatório no crescimento do hepatócito e indica que uma ligação persistente de síntese e sinalização com receptor de EGF (EGFR) contribui para a desregulação autócrina dos nódulos de regeneração em fígado cirrótico (Körmövesa, 2000).

Identificamos os receptores de bradicinina B1 e B2 (genes BDKRB1 e BDKRB2) presentes nas vias de regulação da actina do citoesqueleto e cascatas de coagulação e complemento com expressão aumentada na cirrose secundária a EHNA, confirmando o papel destes genes nas doenças crônicas inflamatórias, em especial nas doenças hepáticas crônicas (Cugno,

2001). Estes achados estão em concordância com recente estudo de Sancho-Bru et al. (2007), que mostraram expressão aumentada dos receptores de bradicinina B1 e B2 em fígados fibróticos e nas células estreladas do fígado de animais com lesão hepática crônica.

A bradicinina é um dos principais efetores do sistema caliceína-cinina. É formada principalmente, pela clivagem proteolítica de cininogênio pela enzima caliceína, podendo ser encontrada no sangue, mas é também produzida localmente em muitos tecidos. É um peptídeo vasodilatador com ações pró-inflamatórias e fibrinolíticas e age através de dois receptores de membrana: receptor de bradicinina B1 e receptor de bradicinina B2. Os receptores B2 são constitutivamente expressos na maioria dos tecidos, enquanto que os receptores B1 não são geralmente expressos em condições normais, mas podem se apresentar com regulação aumentada em tecidos com inflamação. A bradicinina, devido ao seu efeito vasodilatador, age em locais com lesão tecidual ou inflamação, aumentando a permeabilidade vascular e estimulando nervos aferentes (Campbell, 2001).

Estudo comparando o perfil de expressão gênica de pacientes com EHNA com grau de fibrose moderado com o de pacientes com esteatose pura isolada identificou 27 genes com expressão aumentada e 23 com expressão diminuída em tecido hepático proveniente de pacientes com EHNA. Estes genes foram associados à resistência insulínica, adesão celular, disfunção na eliminação do ferro, estresse oxidativo, processo inflamatório, fibrose, disfunção mitocondrial e na patogênese do carcinoma (Yoneda, 2006).

Através deste levantamento da literatura, com maior ênfase aos estudos realizados em humanos, pudemos observar que os recentes avanços na tecnologia de microarranjos de cDNA, têm permitido a caracterização do perfil de expressão gênica e o delineamento de várias vias moleculares e processos celulares alterados nos diferentes estágios de evolução da DHGNA. No entanto, ao avaliarmos minuciosamente cada um destes estudos, verificamos uma grande heterogeneidade nas plataformas empregadas para a caracterização destes perfis, bem como nos critérios estabelecidos para a análise diferencial de expressão, o que dificulta sobremaneira a comparação de resultados.

A avaliação da expressão gênica em nosso estudo mostrou modulações em várias vias, dentre as quais, algumas já sabidamente alteradas em processos inflamatórios crônicos, especialmente no estágio final da cirrose hepática. Em função da patogênese da cirrose secundária a EHNA relacionada à resistência a insulina, propusemos que a via de sinalização do mTOR possa ser específica para a cirrose desta etiologia, dada sua recente associação com a via do receptor de insulina alterada (Khamzina, 2005; Korshennikova, 2006; Marshall, 2006) corroborando recentes achados, os quais demonstraram a participação da via de sinalização do mTOR na patogênese da DHGNA possibilitando, assim a identificação de potenciais marcadores em casos de cirrose secundária a EHNA, onde ainda existem pacientes diagnosticados como cirrose criptogênica.

6.

CONCLUSÃO

Nosso estudo permitiu a identificação de nove vias metabólicas moduladas e seus respectivos 68 genes não redundantes, com significância estatística, na cirrose secundária à esteatohepatite não alcoólica.

As vias com regulação diminuída na cirrose secundária à esteatohepatite não alcoólica em comparação ao fígado normal foram: biosíntese de esteróides, sistema de sinalização do fosfatidilinositol, metabolismo da pirimidina e a via de sinalização do mTOR. Em relação às vias com expressão aumentada encontramos: sinalização do receptor de células T, interação matriz extracelular-receptor, interação receptor citocina-citocina, regulação da actina do citoesqueleto e cascatas da coagulação e do complemento.

Destas vias, a via de sinalização do mTOR e sua proteína efetora 4EBP-1 mostraram-se com expressão alterada na cirrose relacionada à esteatohepatite não alcoólica em comparação aos outros tipos de cirrose, quando foram agregados os resultados da expressão protéica pelo método imunohistoquímico.

A avaliação da expressão protéica de 4EBP-1 pelo método imunohistoquímico poderia ser utilizada para o diagnóstico diferencial da cirrose secundária à esteatohepatite não alcoólica *versus* cirrose de outra etiologia, quando a etiologia é desconhecida.

7.

ANEXOS

Anexo A

MIAME (Minimal Information About a Microarray Expression) Checklist

1. Experimental Design

This experiment is a biological comparison of normal liver tissue and non alcoholic steatohepatitis related cirrhosis (NASH/Cir) using CodeLink™ Human Whole Genome 55K I Bioarray. Six experiments were performed, using 3 samples of Normal liver [Homo sapiens] and 3 samples of NASH/Cir [Homo sapiens], using 6 arrays [CodeLink™ Human Whole Genome 55K I Bioarray - GE Healthcare Bio-Sciences (Amersham Biosciences)], producing 6 raw data files.

a) Authors: Kubrusly MS; Correa-Giannella ML; Bellodi-Privato M; Sa SV; Oliveira CPMS; Soares IC; Wakamatsu A; Alves VAF; Giannella-Neto D; Bacchella T; Machado MCC. Laboratory of Experimental Surgery LIM-37, Laboratory of Cellular and Molecular Endocrinology LIM-25, and Laboratory of Pathology LIM-14, (School of Medicine), University of Sao Paulo-SP, Brazil. Av. Dr. Arnaldo, 455, Zip Code: 01246-903, São Paulo-SP, Brazil, Phone/Fax: +5511-3061-7270, msk@usp.br

b) Type of experiment: Normal liver vs. NASH/Cir comparison

c) Experimental variables: Three NASH/Cir were tested and 3 Normal liver

d) Number of hybridizations: One

- Samples ID: S1 (#1), S2 (#2), S3 (#3), S4 (#4), S5 (#5), S6 (#6)

- Extracts: e1S1, e1S2, e1S3, e1S4, e1S5, e1S6

- Labeled extracts: l1e1S1, l1e1S2, l1e1S3, l1e1S4, l1e1S5, l1e1S6

- Array type: T1 (Normal liver), T2 (NASH/Cir)

- Hybridizations: H1 = T1 (l1e1S1, l1e1S2, l1e1S3) + T2 (l1e1S4, l1e1S5, l1e1S6)

e) Quality control steps:

- Total RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis prior to use in first-strand synthesis of cDNA.

- cRNA quality and purity was assessed by spectrophotometry and by agarose gel electrophoresis before fragmentation and hybridization. cRNA should have a size centered around ~200 bp.

- Controls for target preparations and hybridizations were measured by the addition of a set of 6 bacterial control mRNAs.

- Three biological replicates were made for NASH/Cir and 3 biological replicates for Normal liver.

2. Array Design

This study used commercially available CodeLink™ Human Whole Genome 55K I Bioarray, GE Healthcare Bio-Sciences (Amersham Biosciences), CodeNumber: 300026-4049. These are spotted, high density oligonucleotide arrays which can interrogate approximately 54,841 gene entities. More detailed information may be found at www.amershambiosciences.com/codelink.

2.1. Array copy:

- Samples ID: #1, #2, #3, #4, #5, #6
- Array design name: CodeLink™ Human Whole Genome 55K I Bioarray

2.2. Array design:

a) Array related information:

- Array design name: CodeLink™ Human Whole Genome 55K I Bioarray
- Platform type: spotted
- Array provider: GE Healthcare Bio-Sciences (Amersham Biosciences), Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England HP7 9NA. www.amershambiosciences.com
- Surface type: glass
- Surface type name: CodeLink™ Activated Slides
- Physical dimensions of slide: 25 x 75 x 1 mm
- Number of elements on the array: ~54,841
- Expiration date: H = 05/31/2005
- Experimental date: H = 12/03/2004

b) Properties of each spots on the array:

- Simple
- Element type: synthetic oligonucleotides
- Single stranded
- Spot dimensions: 45 µ
- Attachment: covalent

c) Specific properties of each spot on the array:

- Oligonucleotide lengths: 30-mer
- Gene list links: http://www.amershammedia.com/codelink_files/300026.txt

3. Samples used, extract preparation and labeling

All samples were prepared and labeled in the same manner.

a) Sample source:

- Samples ID: #1, #2, #3, #4, #5, #6
- Organism: Homo sapiens
- Liver tissues: 3 liver tissues from donor liver wedge biopsies taken at transplantation (#) and 3 confirmed NASH/Cir

b) Protocol for preparing the sample:

- Assessment of RNA from hepatic tissues: Total RNA was isolated using TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were purified with RNeasy® mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the protocol recommendation. Total RNA integrity was assessed by denaturing agarose gel electrophoresis and concentrations were calculated by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc, DE, USA).
- Target synthesis and labeling: CodeLink Expression Assay Reagent Kit, according protocol recommended by GE Healthcare Bio-Sciences (Amersham Biosciences).
- First-strand cDNA synthesis: The poly(A)+ RNA subpopulation (within total RNA population) was primed for reverse transcription by a DNA oligonucleotide containing the T7 RNA polymerase promoter 5' to a d(T)24 sequence. Two µg of total RNA, 1 µL of bacterial control (described below) and 1 mL of T7 oligo(dT) primer was heated at 70 °C for 10 min and cooled on ice for 3 min. First-strand reaction components (2 µL first-strand buffer, 4 µL 5 mM dNTP mix, 1 µL RNase inhibitor and 1 µL reverse transcriptase) were added and incubated for 2 h at 42 °C on a water bath.
- Second-strand cDNA synthesis: Second-strand reaction components (10 µL 10X second strand buffer, 4 µL 5 mM dNTP mix, 2 µL DNA polymerase mix and 1 µL RNase H) were added to first-strand cDNA reaction and incubated for 2 h at 16 °C in an incubator. Subsequently, second-strand cDNA reaction was purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH), according to the manufacturer's instructions. The cDNA solution was concentrated in a SpeedVac concentrator under medium heat to 9.5 µL final volume.
- *In vitro* Transcription (IVT) reaction - cRNA synthesis: After second-strand cDNA synthesis and purification, the cDNA serves as the template for an IVT reaction to produce the target cRNA. Purified cDNA was added to a mixture containing 4 µL T7 reaction buffer, 4 µL T7 ATP solution, 4 µL T7 GTP solution, 4 µL T7 CTP solution, 3 µL T7 UTP solution, 7.5 µL 10 mM biotin-11-UTP (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) and 4 µL 10X T7 enzyme mix. The reaction mixture was incubated for 14 h in an air incubator at 37 °C. Biotin-labelled cRNA was recovered with RNeasy™ mini kit (Qiagen GmbH), following the protocol instructions. cRNA concentrations were calculated by spectrophotometry and

500 ng were analyzed by an agarose gel eletrophoresis . Samples were stored at -70 °C or taken directly to the next reaction.

- Fragmentation of cRNA: A standard fragmentation reaction volume was 25 µL using 10 µg of cRNA in 5X fragmentation buffer. The reaction was incubated in a thermal cycler and heat for 20 min at 94 °C using the heated lid feature. After incubation the fragmented samples were placed on ice for at least 5 min.
- Preparation of hybridization reaction mixtures: The standard hybridization mixture volume was 260 µL, containing fragmented cRNA, 78 µL hybridization buffer component A and 130 µL hybridization buffer component B. The hybridization solution was incubated at 90 °C for 5 min to denature the cRNA. Tube was cooled on ice for at least 5 and no more than 30 min.
- External controls (spikes): A set of bacterial control mRNAs is included in CodeLink Expression Assay Reagent Kit (GE Healthcare Bio-Sciences [Amersham Biosciences]) as controls for the cDNA synthesis and IVT reactions. These controls were added to the total RNA sample during target preparation. Each step of the CodeLink Expression Bioarray processing procedure, including target preparation and hybridization, can be monitored using these control mRNAs. Additionally, the bacterial control mRNAs can be used to estimate the sensitivity of RNA detection. For every 1 µg of total RNA used in target preparation, a 1 µL working solution of bacterial control mRNAs was used, containing 0.1 pg of each *araB*, *entF*, *fixB*, *gnd*, *hisB* and *leuB*.

4. Hybridization procedures and parameters

Six hybridizations were processed in a single experiment (H)

$$H1 = T1 (\#1, \#2, \#3) + T2 (\#4, \#5, \#6)$$

- Loading of reaction mixtures into bioarray chambers: The 12-slide shaker tray was set on a level surface and the bioarrays placed with input/output ports facing up. Hybridization mixtures (260 µL) were slowly injected into the Flex Chamber and the ports were sealed with sealing strips.
- Hybridizations: Bioarrays were placed in the shaking incubator (pre-heated) at 37 °C and at 300 rpm rotation for 18 h. Time incubations were the same for all hybridizations experiments, in order to allow future comparisons.
- Post-hybridization washes: Using the removal tool, the Flex Chamber was removed from each bioarray by lifting the tab and slowly pulling it back at 60° angle without creasing the Flex Chamber. The bioarray was put immediately into a medium reagent reservoir containing 13 mL 0.75X TNT buffer (0.10 M Tris-HCl pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween 20) at ambient temperature. The last step was repeated for each hybridized bioarray. All bioarrays were transferred to a large reagent reservoir containing pre-warmed 240 mL 0.75X TNT buffer at 46 °C for exactly 1 h.

- Detection with streptavidin-dye conjugate: The bioarrays were removed from the large reagent reservoir at 46 °C and placed into the small reagent reservoir containing 6.8 µL Cy-5 Streptavidin + 3.4 mL TNB buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.5 % NEN blocking reagent [Perkin Elmer]) solution per array, for 30 min at room temperature and protected from ambient light to prevent photo-bleaching.
- Post-detection washes: Bioarrays were placed into large reagent reservoir containing 240 mL 1X TNT buffer (0.10 M Tris-HCl pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween 20) and incubated for 5 min at room temperature covered from light. This step was repeated with 3 additional large reagent reservoirs containing fresh 240 mL 1X TNT buffer for a second, third and forth washes. After all 1X TNT buffer washes, the bioarrays were transferred into the large reagent reservoir with 240 mL 0.1X SSC/ 0.05 % Tween 20 at room temperature. The slides were incubated for 30 s while continually agitating mildly up and down and then dried by centrifugation at 2000 rpm (644 x g), acceleration 9 and deceleration 9 for 3 min. Upon completion of the wash series, the slides were scanned.

5. Measurement data and specifications

a) Scanning information:

- Samples ID: #1, #2 #3, #4, #5, #6
- Scanning specifications: Arrays were scanned using GenePix® 4000B Array Scanner (Axon Instruments, Foster City, CA, USA).
- Scanning parameters:
 - Laser power: 100 %
 - Wavelength: 635 nm
 - Pixel space: 10 µm
 - Focus position: 0 µm
 - PMT voltage: 600 V

b) Image analysis and quantification:

- Data analysis: The ~55,000-spot intensities on the microarray image were quantified in CodeLink Expression Array Software (GE Healthcare Bio-Sciences), where the intensity of each spot was divided by the array's intensity median to provide a scaled and comparable number across multiple arrays.
- Quality Control (QC): Statistical methods were applied to each spot to identify low expressed genes within the noise boundary. Spots with any background contamination, shape irregularity, or pixel saturation were flagged, and a bioarray QC report summarizes all quality flags for each array in a batch. At least 70 % of mean normalized intensity positive controls from all experiments presented above cut-off calculated for each bioarray and negative controls showed intensities below this value.

-
- **Filtering and data transformation:** Microarray data analysis was performed comparing the two groups mentioned in the section above (Normal liver vs. NASH/Cir) after false-discovery rate was minimized by filtering out genes with missing spots. Reliable measurements were defined as those having a flag value of at least 40 % of “G” (good) as assigned by the software. Intensity of each spot was divided by the array’s intensity median to provide a scaled and comparable number across multiple arrays. The expression values of these genes were normalized individually across all arrays by taking the intensity values in one increasing order subtracted by 0.5 and divided by the size of the sample (Q-value). Expression ratio was calculated by the difference between the averages of Q-transformed values from 3 Normal liver and 3 NASH/Cir arrays, multiplied by 10. Unpaired Student’s t-test was used for two-group statistical comparisons. The level of significance was set at $p < 0.05$. The gene list generated represents the expression changes of >2-fold in Normal liver compared to NASH/Cir group. Differentially expressed genes were selected according 3 basic criteria: measurements of “G” flag, statistically significant ratio at probability levels of $p < 0.05$ and differential expression either up or down-regulated by at least 2-fold in the average to Normal liver compared to NASH/Cir data. Unsupervised hierarchical clustering analysis was performed among differentially expressed genes. JMP Version 5.1 statistical computer program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for data analysis and hierarchical clustering of microarray data.

Anexo B

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.07.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 634/06 , intitulado: "Identificação de marcadores moleculares associados à cirrose criptogênica" apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dr(a): Márcia Saldanha Kubrusly

CAPPesq, 27 de Julho de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8.

REFERÊNCIAS

Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 39–45.

Alwis NMW, Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2007; 27(1): 44-54.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Tarver LI, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin G M, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25: 25-9.

Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1578–82.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346 (16): 1221-31.

Baranova A, Schlauch K, Gowder S, Collantes R, Chandhoke V, Younossi ZM. Microarray technology in the study of obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25(6):1091-6.

Baranova A, Liotta L, Petricoin E, Younossi ZM. The role of genomics and proteomics: technologies in studying non-alcoholic fatty liver disease. Clin Liver Dis 2007; 11: 209-20.

Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. Gastroenterology 2002; 122 (6):1609-19.

Befeler AS, Hayashi PH, Di Bisceglie AM. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2005; 128 (6):1752-64.

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FCP, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Shulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nat Genet 2001; 29(4): 365-71.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. Am J Gastroenterol 1999; 94: 2467-74.

Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2002; 123: 134-40.

Bugianesi E, Mc Cullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. Hepatology 2005; 42: 987-1000.

Cai D, Yuan M, Frantz D, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. Nat Med 2005; 11: 183-90.

Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-69.

Calvert VS, Collantes R, Elariny H, Afendy A, Baranova A, Mendoza M, Goodman Z, Liotta LA, Petricoin EF, Younossi ZM. A systems biology approach to the pathogenesis of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease using reverse phase protein microarrays for multiplexed cell signaling analysis. *Hepatology* 2007; 46: 166-72.

Campbell DJ. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 1060–65.

Chitturi S, Farrell G. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41.

Cugno M, Salerno F, Nussberger J, Bottasso B, Lorenzano E, Agostoni A. Bradykinin in the ascitic fluid of patients with liver cirrhosis. *Clin Sci* 2001; 101: 651–57.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998; 8(114): 842-5.

Day CP. NASH-related liver failure: one hit too many? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(8): 1872-3.

Day CP. Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006a; 26: 1021–28.

Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med* 2006b; 6:19-25.

Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: The mist gradually clears. *J Hepatol* 2008; 48: S104–S112.

De Gottardi A, Vinciguerra M, Sgroi A, Moukil M, Ravier-Dall'Antonia F, Pazienza V, Pugnale P, Foti M, Hadengue A. Microarray analyses and molecular profiling of steatosis induction in immortalized human hepatocytes. *Lab Invest* 2007; 87: 792–806.

Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 303–6.

Dorris DR, Nguyen A, Gieser L, Lockner R, Lublinsky A, Patterson M, Touma E, Sendera TJ, Elghanian R, Mazumder A. Oligodeoxyribonucleotide probe accessibility on a three-dimensional DNA microarray surface and the effect of hybridization time on the accuracy of expression ratios. *BMC Biotechnol* 2003, 3: 6-11.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557–76.

Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12(3): 181-9.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-53.

Federico A, Trappoliere M, Loguercio C. Treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: current views and perspectives. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 789-801.

Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125(2): 437-43.

Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23: 3151–71.

Friedman SL. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 (1): S38–53.

Harvey PJ, Gready JE, Yin Z, Le Couteur DG, McLean AJ. Acute oxygen supplementation restores markers of hepatocyte energy status and hypoxia in cirrhotic rats. *J Pharm Exp Therap* 2000; 293(2):641–45.

Hashimoto M, Kothary PC, Eckhauser FE, Raper SE. Treatment of cirrhotic rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1259-65.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-45.

Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease *Histopathology* 2006; 49: 450–65.

Ji C, Kaplowitz N. ER stress: Can the liver cope? *J Hepatol* 2006; 45: 321-33.

Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: Possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 2005; 146: 1473-81.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6):1313-21.

Kömüvesa LG, Ferenc A, Jonesb AL, Fodor E. Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic liver disease. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 821–30.

Kononen J, Bubendorf L, Kallionimeni A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallionimeni OP. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7.

Korsheninnikova E, Van Der Zon GCM, Voshol PJ, Janssen GM, Havekes LM, Grefhorst A, Kuipers F, Reijngoud DJ, Romijn JA, Ouwens DM, Maassen JA. Sustained activation of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway is associated with hepatic insulin resistance, but not with steatosis, in mice. *Diabetologia* 2006; 49: 3049-57.

Kuo WP, Kim EY, Trimarchi J, Jenssen TK, Vinterbo SA, Ohno-Machado L. A primer on gene expression and microarrays for machine learning researchers. *J Biomed Inform* 2004; 37(4): 293-303.

Laennec RTH. De l'auscultation mediate. Paris, Brosson et chaude, 1819.

Le Bacquer O, Petroulakis E, Paglialunga S, Poulin F, Richard D, Cianflone K, Sonenberg N. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J Clin Invest* 2007; 117: 387-96.

Le TH, Caldwell SH, Redick JA, Sheppard BL, Davis CA, Arseneau KO, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Al-Osaimi A, Peterson TC. The zonal distribution of megamitochondria with crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 1423-29.

Lemmer ER, Friedman SL, Llovet JM. Molecular diagnosis of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: the potential of gene expression profiling. *Semin Liver Dis* 2006; 26(4): 373-84.

Leong HX, Simkevich C, Lesieur-Brooks A, Lau BW, Fugere C, Sabo E, Thompson NL. Short-term arginine deprivation results in large-scale modulation of hepatic gene expression in both normal and tumor cells: microarray bioinformatic analysis. *Nutrition & Metabolism* 2006, from: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/3/1/37>

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-8.

Marshall S. Role of Insulin, Adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE* 2006 (346), re7. [DOI: 10.1126/stke.3462006re7]

McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 (1): S17-29.

Mincis M, Mincis R. Cirrose Hepática. In: Coelho, Júlio Cezar Uili. *Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p.1344-70.

Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsusumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4365-70.

Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol* 2006; 45: 786–96.

Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 9853-64.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligi GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306: 457-61.

Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 (1): 79-84.

Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69.

Poniachik J, Csendes A, Díaz JC, Rojas J, Burdiles P, Maluenda F, Smok G, Rodrigo R, Videla LA. Increased production of IL-1 α and TNF- α in lipopolysaccharide-stimulated blood from obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 2006; 33(5): 252-7.

Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology* 2000; 32: 689-92.

Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, Younossi Z, Albrecht J. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38:75-85.

Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A, Gieser L, Touma E, Lockner R, Tata M, Zhu X, Patterson M, Shippy R, Sendera TJ, Mazumder A. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(7): 1-12.

Rössle R: Entzündungen der Leber. In: Friedrich Henke and Otto Lubarsch, publishers: *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie und histologie*. 1930; 5(1): 243 Berlin.

Rubio A, Guruceaga E, Vázquez-Chantada M, Sandoval J, Martínez-Cruz LA, Segura V, Sevilla JL, Podhorski A, Corrales FJ, Torres L, Rodríguez M, Aillet F, Ariz U, Arrieta FM, Caballería J, Martín-Duce A, Lu SC, Martínez-Chantar ML, Mato JM. Identification of a gene-pathway associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2007; 46: 708-8.

Sancho-Bru P, Bataller R, Fernandez-Varo G, Moreno M, Ramalho LN, Colmenero J, Marí M, Clària J, Jiménez W, Arroyo V, Brenner DA, Ginès P. Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. *Gastroenterology* 2007;133: 2019-28.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120 (5): 1183-1192.

Sanyal AJ. Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2 (1): 46-53.

Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Heuman D, Coterrell A, Fisher RA, Contos MJ, Mills AS. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 682-89.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270 (5235): 467-70.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-48.

Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38(1): 244-51.

Tan PK, Downey TJ, Spitznagel Jr EL, Xu P, Fu D, Dimitrov DS, Lempicki RA, Raaka BM, Cam MC. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(19): 5676-84.

Taniai M, Hashimoto E, Tobari M, Takakura M, Yatsuji S, Tokushige K, Shiratori K. Hepatic gene expression in patients with NASH in relation to hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: A-767. [Abstract #544]

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2004; 5: 836-47.

Usami M, Saitoh Y. The effect of a nucleotide-nucleoside solution on hepatic regeneration in rats after partial hepatectomy and in primary monolayer culture of hepatocytes. *Nutrition* 1997; 13: 365-68.

Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz JC, Smok G, Thielemann L, Poniachik J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci* 2004; 106: 261-68.

Yang L, Che-Chang C, Oh-Sang K, Songling L, J McGheeseon, Stimpson SA, Lihong ZC, Harrington WW, Symonds WT, Rockey DC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G902–11.

Yang L, Jhaveri R, Huang J, Qi Y Diehl AM. Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers. *Lab Invest* 2007; 87: 927–37.

Yoneda M, Fujita K, Endo H, Nozaki Y, Kirikoshi H, Saito S, Aburatani H, Nakajima A. Global gene expression analysis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) compared with nonalcohol steatosis. *Gastroenterology* 2006; 130: A-827 [Abstract # M1961].

Younossi ZM, Gorreta F, Ong JP, Schlauch K, Giacco LD, Elariny H, VanMeter A, Younoszai A, Goodman Z, Baranova A, Christensen A, Grant G, Chandhoke V. Hepatic gene expression in patients with obesity-related non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2005a; 25(4): 760-71.

Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Del Giacco L, Schlauch K, Born TL, Elariny H, Gorreta F, VanMeter A, Younoszai A, Ong JP, Goodman Z, ChandhokeV. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005b; 42(3): 665-74.

Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Pract & Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 733-42.

Yauk CL, Berndt ML, Williams A, Douglas GR. Comprehensive comparison of six microarray technologies. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(15): 1-7.

Yudkin JS. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2007; 39: 707–9.