## JOSÉ TADEU STEFANO

# Efeito do interferon- $\alpha$ sobre a expressão de genes do sistema IGF em pacientes portadores de hepatite C

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental Orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Celso Bosco Massarollo

> São Paulo 2005

Esta tese está de acordo com:

Referências: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancuver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

"Toda alegria que há neste mundo vem do desejo de que todos sejam felizes, e toda a dor que há neste mundo vem do desejo de que eu mesmo seja feliz".

Shantideva

"Temo a inveja tanto quanto aprecio os vãos louvores do mundo... e vou sozinho por caminhos não trilhados..."

Michelangelo

À minha mãe, Quitéria Maria, "in memorian", pelo amor sempre presente em nossas vidas.

Ao meu pai, Alcides Stefano, pelo carinho e apoio, fundamentais na minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto, professor Livre Docente da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP e responsável pelo Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM/25 da FMUSP. Meu respeito e admiração por sua postura científica. Agradeço pela orientação profissional e pessoal despendidas na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Celso Bosco Massarollo, médico do Departamento de Cirurgia do HC-FMUSP, por ter possibilitado a realização de um trabalho interdisciplinar. Pela orientação, apoio e sugestões.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella, médica da Unidade de Diabetes e do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM/25 da FMUSP, por acreditar veementemente no meu trabalho, fator imprescindível à realização desta tese.

À equipe multidisciplinar do Departamento de Cirurgia -Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado do HC-FMUSP, pela relevante participação em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, professor Titular do Departamento de Patologia do HC-FMUSP, pela preciosa colaboração na análise dos achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos. À Dra. Cristiane Maria Freitas Ribeiro, médica do Departamento de Patologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela minuciosa revisão de lâminas do anatomopatológico e pela cuidadosa análise imuno-histoquímica realizada em tecido hepático de pacientes portadores de hepatite C.

À Ana Mercedes de Sousa Cavaleiro, biomédica do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM/25 da FMUSP, pela amizade, fidelidade e participação irrestrita em todas as etapas deste trabalho.

À Maria Angela Henriques Zanella Fortes, bióloga do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM/25 da FMUSP, pela gentileza com que providenciou o desenho dos "primers" utilizados neste trabalho.

À Norisa Amadeo Herrera, secretária do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM/25 da FMUSP, pela cordialidade com que me recebeu desde o meu primeiro contato com esta instituição.

À Sonia Fernandes, secretária do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da FMUSP e a sua equipe, pela presteza com que solucionaram questões referentes ao curso de pós-graduação. À Ana Lúcia Garippo e Angela Batista Gomes dos Santos, biólogas do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, pela cuidadosa padronização e execução do estudo imuno-histoquímico realizado em tecido hepático de pacientes portadores de hepatite C.

Aos funcionários, estagiários e pós-graduandos do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM/25 da FMUSP, pelo coleguismo e espírito de equipe.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Ricardo Landi, meu estimado amigo, meu sincero reconhecimento pelo companheirismo, inesgotável paciência e apoio incondicional dedicados no decorrer destes anos. Obrigado por me acompanhar em mais esta jornada.

A todos os pacientes portadores de hepatite C que participaram deste estudo.

## **SUMÁRIO**

Lista de Abreviaturas e Siglas Lista de Símbolos Lista de Fórmulas Lista de Figuras Lista de Tabelas Resumo Summary I. INTRODUÇÃO ...... 01 2. O Sistema IGF ..... 11 3. O Sistema IGF e o Sistema Imune ...... 14 4. O Sistema IGF e as Doenças Hepáticas ...... 17 2.1. Determinações Bioquímicas ...... 30 2.2. Separação Negativa das Células B ...... 33 2.2.1. Preparação das Células Mononucleares (MNC) ..... 33

2.2.2. Procedimento de Lavagem das Microesferas	. 34
2.2.3. Separação das Células B das MNC	. 34
2.3. Separação Negativa das Células T	. 36
2.3.1. Separação das Células T das MNC	. 36
3. Processamento do Tecido Hepático	. 38
3.1. Histologia do Tecido Hepático	. 38
3.2. Estudo Imuno-histoquímico para o IGF-IR	. 41
3.2.1. Desparafinação	41
3.2.2. Hidratação	. 41
3.2.3. Bloqueio	. 42
3.2.4. Recuperação Antigênica	42
3.2.5. Incubação com o Anticorpo Primário	. 42
4. Expressão Gênica	. 44
4.1. Extração do RNA Celular	44
4.2. Extração do RNA Tecidual	45
4.3. Quantificação do RNA Total	. 45
4.4. Análise da Integridade do RNA Total	. 46
4.5. Determinação Semiquantitativa da Expressão de mRNA	
dos Genes do IGF-I e do IGF-IR por RT-PCR	48
4.6. Síntese do DNA Complementar (cDNA)	48
4.6.1. Curva de Aferição do Número de Ciclos para as	
RT-PCRs	49
4.6.2. Gradiente de Temperatura	. 54

4.6.3. Reação de Co-amplificação dos Genes de
Interesse 56
4.6.3.1. Tecido Hepático 56
4.6.3.2. Linfócitos T e B 57
5. Quantificação da Carga Viral 67
6. Análise Estatística 68
IV. RESULTADOS
1. Análise da Função Hepática 70
2. Análise do Eixo GH-IGF-IGFBP 77
3. Análise da Expressão dos Genes do IGF-I e do IGF-IR
4. Análise Imuno-histoquímica do IGF-IR
5. Análise Comparativa dos Diferentes Achados
V. DISCUSSÃO 101
VI. CONCLUSÕES 116
VII. ANEXOS 120
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 134

### RESUMO

Stefano JT. Efeito do interferon- $\alpha$  sobre a expressão de genes do sistema IGF em pacientes portadores de hepatite C [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 163p.

A presente investigação teve por objetivo estudar o papel do eixo GH-IGF-IGFBP no tecido hepático e nos linfócitos T e B de pacientes portadores do vírus da hepatite C, em terapia com INF- $\alpha$  e ribavirina nos períodos pré e pós-tratamento. Dados da literatura têm evidenciado o envolvimento do IGF-I na modulação da resposta imune, bem como sua atuação como fator de crescimento para células imunológicas, além de apresentar valor preditivo na avaliação da reserva hepática desses pacientes. O número final de pacientes abordados perfez o total de 80. Destes, 39 iniciaram tratamento conforme protocolo estabelecido pela equipe clínica. Quatro pacientes foram excluídos durante o curso do tratamento, sendo 2 por óbito e 2 por transtorno depressivo grave com ideação suicida. Dos 35 pacientes que concluíram o tratamento, 18 apresentaram resposta virológica ao final do tratamento. Destes, 15 pacientes (43%) obtiveram resposta virológica sustentada (RVS). As médias das U.A. (unidades arbitrárias) das enzimas AST e ALT foram estatisticamente diferentes entre os períodos pré e pós-tratamento, tanto para os pacientes que apresentaram RVS quanto para aqueles que não apresentaram tal resposta. No grupo de pacientes com RVS, observou-se que a média dos níveis basais de AST foi menor quando comparada à do grupo de pacientes sem RVS. A média das concentrações plasmáticas basais de IGF-I livre no grupo de pacientes com RVS foi estatisticamente maior quando comparada à do grupo de pacientes não respondedores. As médias das concentrações de IGFBP3 circulante no período pós-tratamento foram estatisticamente diferentes entre os grupos com e sem RVS. Um aumento do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR foi observado em tecido hepático de todos os pacientes com HCC quando comparado com o tecido hepático normal. Este resultado foi confirmado por análise imunohistoquímica para o IGF-IR. Nos pacientes que apresentaram RVS a magnitude de

expressão de mRNA do IGF-IR em amostras de tecido hepático após o tratamento foram estatisticamente menores em relação ao basal. Tal fato não foi observado no grupo de pacientes não respondedores. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a média do conteúdo de mRNA do IGF-I em tecido hepático dos grupos de pacientes com e sem RVS, pré ou pós-tratamento. A média do conteúdo de mRNA do IGF-I em linfócitos T no grupo de pacientes com RVS foi estatisticamente maior em relação à do grupo de pacientes não respondedores quando se consideram os períodos pré e pós-tratamento conjuntamente. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as médias do conteúdo de mRNA do IGF-IR nos grupos com e sem RVS, pré ou pós-tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do conteúdo de mRNA de IGF-I e IGF-IR em linfócitos B de pacientes portadores do VHC, com e sem RVS e nos períodos pré e pós-tratamento. A diminuição de expressão de mRNA do IGF-IR em tecido hepático, observada no grupo de pacientes com RVS, sugere uma melhora da doença hepática. A hipótese de que um efeito do INF- $\alpha$  sobre os componentes do sistema IGF possa contribuir para este achado não pode ser descartada, porém, é provável que este efeito não seja tão importante, pois não se observou diferenca nos níveis de expressão do IGF-IR hepático no grupo de pacientes não respondedores. Embora a supra-regulação ("up-regulation") do IGF-IR possa participar da regeneração hepática, é preciso elucidar se o aumento da expressão do IGF-IR na HCC resulta da ativação direta do gene pelo VHC ou se é uma conseqüência da agressão ao parênquima. As concentrações plasmáticas de IGF-I livre >1,35 ng/mL puderam ser consideradas preditivas da resposta ao tratamento da hepatite C com uma razão de probabilidade ("odds ratio") de 17,33±1,02 (Limite de confiança: 2,26-127,34).

Descritores: hepatite C crônica, fator de crescimento insulin-like I, receptor IGF tipo I, interferon-α, ribavirina

### SUMMARY

Stefano JT. *Effect of interferon-α on the IGF system gene expression in patients with Hepatitis C [thesis].* São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005. 163p.

The current investigation aimed to study the role of the GH-IGF-IGFBP axis in liver tissue and in T and B lymphocytes in patients with hepatitis C virus (HCV) before and after the rapeutic regimen based on interferon  $\alpha$ -2a or  $\alpha$ -2b (3 million U SC 3x/wk) and ribavirin (1000-1200 mg qid). It has been shown that IGF-I plays an important role in the modulation of the immune response, besides its role as a growth factor for the immunologic cells. It also presents a predictive value in the evaluation of the hepatic reserve of these patients. Among 80 patients enrolled for this investigation, 39 began treatment with interferon- $\alpha$  and ribavirin, according to an established protocol. Two patients were excluded during treatment due to severe depressive disorders accompanied by suicidal thoughts and 2 patients died. Of the 35 patients who concluded the treatment, 18 eventually presented virological response. Of these, 15 (43%) maintained sustained virological response (SVR). The levels of AST and ALT enzymes in both pre and post-treatment periods were statistically different for both patients with SVR and those who did not present such response. In the group with SVR, aminotransferases basal levels were statistically lower when compared to the group of patients without SVR. In the group of nonresponsive patients, the average of the scores of parenchyma activity was statistically lower in post-treatment period when compared to pre-treatment period. Furthermore, comparing post-treatment periods in both groups with and without SVR, the average of the scores of parenchyma activity was statistically lower in the group without SVR when compared to the group with SVR. Mean plasma concentrations of free IGF-I before treatment in patients who eventually achieved SVR was statistically higher in comparison to the group of non-responsive patients. Mean plasma concentrations of IGFBP3 were statistically higher in the group with RVS when compared to the group of patients without SVR. An increase of IGF-IR mRNA content was observed in hepatic tissue from all patients with CHC in comparison to normal liver. These results were confirmed by immunohistochemical analysis for the IGF-IR. IGF-IR mRNA content in liver tissue samples from patients who achieved SVR after treatment was statistically lower than that observed before treatment There was not statistical difference between IGF-I mRNA content in hepatic tissues from both groups of patients with and without SVR, in pre and posttreatment periods. IGF-I mRNA expression in T lymphocytes from patients with SVR was statistically higher in comparison to the non-responsive group of patients, considering both pre and post-treatment periods altogether. No statistical difference was observed in IGF-IR mRNA expression in both groups of patients with and without SVR, in pre and post-treatment periods. The statistical analysis did not disclose any statistically significant differences in IGF-I or IGF-IR mRNA expressions in B lymphocytes from patients with or without SVR, in pre and posttreatment periods. A decrease in hepatic IGF-IR mRNA content observed in patients who achieved SVR after therapy, suggested an improvement in hepatic damage. The hypothesis that the INF- $\alpha$  affects components of the IGF system contributing to these findings could not be discarded. However, it is unlike that these effects would play relevant role because any differences were observed in the hepatic IGF-IR mRNA expression in non-responsive patients. It remains to be elucidated whether IGF-IR up-regulation would be involved in hepatocyte regeneration or CHC would result from direct activation of IGF-IR gene by HCV and/or as a consequence of chronic aggression to hepatic parenchyma. Plasma concentration of free IGF-I >1.35 ng/ml was considered to be a predictive response to the treatment of hepatitis C with a probability ratio (odds ratio) of 17.33±1.02 (confidence interval: 2.26 -127.34).

Keywords: chronic hepatitis C, insulin-like factor I, insulin-like factor I receptor, interferon-α, ribavirin

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sub>260</sub>	absorbância de 260 nm
A <sub>280</sub>	absorbância de 280 nm
ABL	vírus da leucemia murina de Abelson
AKT	proteína serino-treonina cinase B
ALT	alanina amino transferase
anti-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C
AST	aspartato amino transferase
β <sub>2</sub> -MG	beta-2 microglobulina
BCR	"break-point cluster region"
BSA	soro-albumina bovina
CD4	receptor para MHC classe II
CD8	receptor para MHC classe I
cDNA	DNA complementar
CHC	carcinoma hepatocelular
CN	controle negativo
СР	controle positivo
DAB	diaminobenzidine
dATP	desoxiadenina trifosfatada
dCTP	desoxicitosina trifosfatada
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanidina trifosfatada
dL	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
Dr.	doutor
dTTP	desoxitimidina trifosfatada
ECs	células endoteliais
ED <sub>50</sub>	dose efetiva de 50 por cento
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EPM	erro padrão da média
et al.	e outros

F	feminino
FA	fosfatase alcalina
γ-GT	gama glutamil transferase
GGT	gama glutamil transferase
GH	hormônio de crescimento
GHR	receptor do hormônio de crescimento
HCC	hepatite C crônica
hGH	hormônio do crescimento humano
HSCs	células estreladas hepáticas
HVC	hepatite viral do tipo C
IGF(s)	fator(es) de crescimento insulina-símile
IGFBP(s)	proteína(s) ligante(s) do fator de crescimento insulina-símile
IGFBP1	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile tipo 1
IGFBP2	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile tipo 2
IGFBP3	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile tipo 3
IGFBP4	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile tipo 4
IGFBP5	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile tipo 5
IGFBP6	proteína ligante do fator de crescimento insulina-símile tipo 6
IGF-I	fator de crescimento insulina-símile tipo I
IGF-II	fator de crescimento insulina-símile tipo II
IGF-R(s)	receptor(es) do(s) fator(es) de crescimento insulina-símile
IGF-IR	receptor do fator de crescimento insulina-símile tipo l
IGF-IIR	receptor do fator de crescimento insulina-símile tipo II
IHQ	imuno-histoquímica
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-2R	receptor de interleucina 2
IMC	índice de massa corpórea
INF(s)	interferon(s)
IR	receptor de insulina
KCs	células de Kupffer
LC	limite de confiança
LMC	leucemia mielóide crônica
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno

Μ	masculino
min	minutos
MNC	células mononucleares
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanesulfônico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
M-6-P	manose-6-fosfato
M-6-P-R	receptor manose-6-fosfato
n	número
NIH	"National Institute of Health"
NK	células "natural killer"
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	"odds ratio" - razão de chance
р.	página
PBGD	porfobilinogênio desaminase
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salina
PEG-INF	interferon peguilado
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinase
PKB	proteína cinase B
PM	marcador de peso molecular
Prof.	professor
RAF	proteína homóloga à do oncogêne viral da leucemia murina
RAS	proteína homóloga à do vírus do sarcoma de Rous
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
RT	transcriptase reversa
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase pós transcriptase reversa
RVS	resposta virológica sustentada
RVS (+)	com resposta virológica sustentada
RVS (-)	sem resposta virológica sustentada
S	segundos
S.C.	sub-cutânea

ТА	temperatura ambiente
Taq	DNA polimerase purificada da bactéria Thermus aquaticus
TBE	tris-ácido bórico-EDTA
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
U	unidades
U.A.	unidades arbitrárias
U.A.D.O.	unidades arbitrárias de densidade óptica
UI	unidades internacionais
Vol	volume
VHC	vírus da hepatite C

## LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
_	menos que
=	igual a
±	mais ou menos que
<	menor que
>	maior que
≤	menor que ou igual a
2	maior que ou igual a
~	aproximadamente
р	significância estatística
ρ	coeficiente de correlação linear de Pearson
°C	graus Celsius
%	por cento
μ	micro
r	coeficiente de correlação linear de Pearson
g	grama
kDa	quiloDalton
kg	quilograma
kg/m <sup>2</sup>	quilograma por metro quadrado
L	litro
m	mili
m	metro
Μ	molar
mg	miligrama
mg/dia	miligrama por dia
mm	milímetro
ng	nanograma
nm	nanômetro

pmoles	picomoles
V	volts
3x/sem	três vezes por semana
3 MU/3x/sem	três milhões de unidades três vezes por semana
3 MU/m²/dia	três milhões de unidades por metro quadrado por dia

## LISTA DE FÓRMULAS

- CCl<sub>4</sub> tetracloreto de carbono
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peróxido de hidrogênio
- KCI cloreto de potássio
- MgCl<sub>2</sub> cloreto de magnésio
- MgSO<sub>4</sub> sulfato de magnésio
- TRIS-HCI tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreto
- TRIS-SO<sub>4</sub> tris(hidroximetil) aminometano sulfato

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando a integridade	
	dos RNAs extraídos de tecido hepático com visualização das	
	bandas 28 e 18 S	47
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNAs de IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) isolados de tecido hepático normal e amplificados por RT-PCR. Nota-se que o tecido hepático normal não expressa o gene para o IGF-IR, apenas o gene para o controle interno BCR	50
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNAs de IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) isolados de placenta humana e amplificados por RT-PCR em diferentes números de ciclos: 1: 25 ciclos, 2: 30 ciclos, 3: 35 ciclos, 4: 40 ciclos, 5: 45 ciclos, 6: 50 ciclos, 7: 55 ciclos, PM: Marcador de peso molecular - 100 pb e CN: Controle Negativo	51
Figura 4	Curva de aferição do número de ciclos para a RT-PCR obtida por co-amplificação dos genes do IGF-IR e do BCR em tecido placentário humano	52
Figura 5	Curva de aferição do número de ciclos para a RT-PCR obtida por co-amplificação dos genes do IGF-I e do BCR em linfócitos T e B	53
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNAs de IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) isolados de placenta humana e amplificados por RT-PCR em diferentes temperaturas de "annealing": <b>1</b> : 51,6 °C, <b>2</b> : 52,7 °C, <b>3</b> : 55,4 °C, <b>4</b> : 56,8 °C, <b>5</b> : 58,1 °C, <b>6</b> : 59,2 °C e <b>7</b> : 60,0 °C	55

Figura 7	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos	
	amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-I e BCR (303 pb	
	e 377 pb) de cDNAs extraídos de tecido hepático dos pacientes	
	1, 2 e 3 (amostras em triplicatas)	58
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos	
	amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-IR e BCR	
	(230 pb e 377 pb) de cDNAs extraídos de tecido hepático dos	
	pacientes 1, 2 e 3 (amostras em triplicatas)	59
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos	
	amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-I e BCR (303 pb	
	e 377 pb) de cDNAs extraídos de linfócitos T e B normais	
	(amostras em triplicatas)	61
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos	
	amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-IR e BCR	
	(230 pb e 377 pb) de cDNAs extraídos de linfócitos T e B	
	normais (amostras em triplicatas)	62
Figura 11	Seqüência de 550 pb dos éxons 1, 2 e 3 do gene do IGF-I.	
	As regiões destacadas correspondem aos amplímeros	
	positivo e negativo utilizados na RT-PCR. O produto final	
	da RT-PCR apresenta 303 pb	64
Figura 12	Seqüência de 301 pb dos éxons 15 e 16 do gene do IGF-IR.	
	As regiões destacadas correspondem aos amplímeros	
	positivo e negativo utilizados na RT-PCR. O produto final	
	da RT-PCR apresenta 230 pb	65
Figura 13	Seqüência de 545 pb dos éxons 10 e 14 do gene do controle	
	interno BCR. As regiões destacadas correspondem aos	
	amplímeros positivo e negativo utilizados na RT-PCR.	
	O produto final da RT-PCR apresenta 377 pb	66

Figura 14	Representação gráfica das médias das U.A. (unidades arbitrárias) das enzimas AST e ALT dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento	72
Figura 15	Representação gráfica das médias dos escores das variáveis das biópsias hepáticas dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento	74
Figura 16	Representação gráfica das médias dos níveis das cargas virais, expressos em UI/ mL, dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento	75
Figura 17	Representação gráfica das médias das concentrações plasmáticas de IGF-I total dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento	78
Figura 18	Representação gráfica das médias das concentrações plasmáticas de IGF-I livre e de IGFBP3 dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento	79
Figura 19	Representação gráfica das médias das concentrações plasmáticas de IGFBP2 dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento	81
Figura 20	Representação gráfica das médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em tecido hepático dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós- tratamento	83
Figura 21	Representação gráfica das médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos T dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós- tratamento	84

Figura 22	Representação gráfica das médias do conteúdo de mRNA	
	dos genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos B dos pacientes	
	portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-	
	tratamento	86

- **Figura 23 A)** Controle Positivo Colangiocarcinoma: Imuno-expressão para IGF-IR em ductos (~ 100X).
  - B) Controle Positivo Colangiocarcinoma: Imuno-expressão intensa na membrana citoplasmática do ducto (~ 200X).
  - C) Tecido Hepático Normal Imuno-expressão em ductos (~ 100X).
- **Figura 24 A)** Imuno-expressão intensa em células ductais e no citoplasma dos hepatócitos (~ 100X).
  - B) Imuno-expressão intensa em células ductais e no citoplasma dos hepatócitos (~ 100X).
  - C) Imuno-expressão intensa em células ductais e no citoplasma dos hepatócitos (~ 100X).
  - D) Imuno-expressão intensa no citoplasma dos hepatócitos distribuídos no lóbulo hepático (~ 100X).
  - E) Imuno-expressão intensa evidenciando padrão granular no citoplasma dos hepatócitos (~ 400X).

Figura 26	Correlação das concentrações plasmáticas de hGH com os
	níveis de expressão de mRNA do gene do IGF-IR em
	tecido hepático e com as U.A. (unidades arbitrárias) da enzima
	ALT dos pacientes portadores do VHC no período
	pré-tratamento
Figura 27	Correlação das concentrações séricas de albumina com as
	concentrações plasmáticas de IGF-I total e livre dos pacientes
	portadores do VHC no período pré-tratamento 97
Figura 28	Correlação dos diferentes graus de estadiamento da atividade
	parenquimatosa das biópsias hepáticas com as concentrações
	plasmáticas de IGF-I livre e de IGFBP3 dos pacientes portadores
	do VHC, no período pré-tratamento 98
Figura 29	Correlação dos diferentes graus de estadiamento da atividade
	parenquimatosa das biópsias hepáticas com os níveis de
	expressão de mRNA do gene do IGF-IR e com as
	concentrações plasmáticas de IGF-I livre dos pacientes
	portadores do VHC no período pré-tratamento
Figura 30	Análise das razões de probabilidade ("odds ratio") das diferentes
	variáveis estudadas calculadas de acordo com o método descrito por
	Wacholder et al., 2004. Os valores em parênteses indicam os níveis
	de corte que propiciariam RVS. As razões estatisticamente
	significativas foram: idade ≤33 anos, IGF-I livre >1,35 ng/mL
	e conteúdo de mRNA de IGF-I em linfócitos T >0,51 e B >0,79
	U.A.D.O

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados demográficos dos pacientes portadores do VHC	26
	pre-tratamento	20
Tabela 2	Classificação e estadiamento das hepatites crônicas	40
Tabela 3	Perfil hepático e carga viral dos pacientes portadores do VHC.	
	Amostragem inicial	71
Tabela 4	Médias dos valores (média ± EPM) dos dados anatomopatológicos	
	e laboratoriais dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS,	
	nos períodos pré e pós-tratamento	76
Tabela 5	Correlações entre os achados anatomopatológicos e os	
	diferentes achados laboratoriais nos pacientes portadores	
	do VHC no período pré-tratamento	93

## I. INTRODUÇÃO

## I. INTRODUÇÃO

## 1. Hepatite C

A hepatite viral do tipo C (HVC) é a maior causa de morbidade e mortalidade relacionada a doenças hepáticas crônicas no mundo. Atualmente, trata-se de um dos maiores problemas de saúde pública, com estimativa de 170 milhões de indivíduos infectados, o que representa 3% da população mundial. Estima-se que 2,5 a 4,9% da população brasileira, aproximadamente 4,1 a 8,0 milhões de indivíduos, sejam portadores do vírus da hepatite C (VHC) (WHO, 1999; WHO, 2000).

O VHC foi identificado em 1989, sendo caracterizado como um RNA vírus, envelopado, de sentido positivo e fita única. Apresenta similaridade com os membros da família *Flaviviridae* e *Pestivirus*, classes que incluem o vírus da dengue, febre amarela, hepatite G e da diarréia bovina (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989; Choo et al., 1991). Devido às mutações sofridas durante sua replicação, decorrentes da ausência de reparo na transcrição do RNA, o mesmo apresenta grande diversidade genética e pode ser agrupado em diferentes classificações, conforme sua similaridade genômica. A análise da sequência genômica do VHC revelou uma considerável variação. As seqüências variantes do genoma ou de fragmentos genômicos têm sido utilizadas para classificar o vírus em seis grupos maiores, ou genótipos (Simmonds et al., 1993; Simmonds et al., 1994).

A nomenclatura proposta por Chan et al. (1992) reflete uma divisão genotípica hierárquica de dois níveis. Os tipos de VHC são designados por numerais arábicos e em ordem de descoberta (genótipo 1, 2, 3, etc.) e subtipos designados por estes numerais seguidos por letras minúsculas e também em ordem de descoberta (1a, 1b, 2a, 2b, etc.). Desde sua descoberta, seis genótipos distintos e 90 subtipos foram identificados (Hoofnagle, 2002).

A maioria dos pacientes acometidos pela HVC é assintomática. Quando presentes, os sintomas são freqüentemente vagos e intermitentes, tais como, indisposição e fadiga. Icterícia, fraqueza e sangramentos gastrintestinais podem ocorrer em presença de cirrose, mas este processo é lento e insidioso (Hoofnagle, 1997).

Aproximadamente, 15 a 20% dos pacientes com hepatite C aguda se recuperam espontaneamente. O restante irá evoluir para hepatite C crônica, com carga viral e enzimas hepáticas persistentemente elevadas. A taxa atual de cronicidade da infecção aguda pelo VHC não está bem estabelecida. Análises retrospectivas sugerem que 75% dos pacientes com infecção aguda desenvolverão doença crônica (Seeff, 1997; Hoofnagle, 2002).

A história natural da HVC crônica é altamente variável, as diferenças relatadas são parcialmente baseadas nos grupos estudados, assim como, nos métodos utilizados para estes estudos. Há, no entanto, outros fatores que também afetam a velocidade de progressão da doença. Estes podem estar relacionados à carga viral, ao hospedeiro e aos agentes externos (Seeff, 2002).

Estima-se que a proporção de pessoas cronicamente infectadas, as quais desenvolverão cirrose 20 anos após a infecção inicial, varie de 2 a 4% em estudos com crianças e mulheres jovens a 20 a 30% em estudos com pessoas de meia idade e que receberam transfusão de sangue. O risco atual é provavelmente intermediário aos dois grupos, estando entre 10 a 15%, mas pouco se sabe sobre a evolução da infecção crônica pelo VHC em períodos mais longos do que duas décadas. Uma vez caracterizada a cirrose, o risco destes pacientes desenvolverem carcinoma hepatocelular (CHC) varia de 0 a 3% ao ano (NIH, 2002; Seeff, 2002).

As duas principais formas de transmissão são o uso de drogas intravenosas e a administração de produtos derivados de sangue contaminado. Esta última via de transmissão desapareceu quase que completamente a partir de 1991, quando houve a implementação obrigatória em bancos de sangue de testes sorológicos para detecção do VHC. De acordo com dados publicados e com variações relevantes em diferentes partes do mundo, não se pode determinar a origem da infecção em cerca de 10 a 30% dos pacientes infectados (Albert e Benvegnù, 2003). Outros possíveis fatores de risco para a transmissão do VHC, no entanto, vêm sendo investigados, embora os resultados sejam conflitantes. Dentre eles, podemos citar exposições percutâneas ou não parenterais, tais como, transmissão sexual, intervenções médicas, acidentes com agulhas potencialmente infectadas, acupuntura, tatuagens e transmissão familiar (EASL, 1999; Memon e Memon, 2002; Clemente e Carrilho, 2003).

Diferente das outras vias de transmissão, nas quais os fatores de risco para a infecção pelo VHC já estão bem estabelecidos, o risco de transmissão sexual é bem menos definido e varia pelo tipo de relacionamento sexual. A transmissão sexual é incomum. A prevalência da infecção pelo VHC em parceiros estáveis de homossexuais e heterossexuais infectados pelo VHC é muito baixa (0 a 0,6% por ano), mas é maior em indivíduos com múltiplos parceiros (0,4 a 1,8% por ano) (EASL, 1999; Terrault, 2002). A transmissão vertical também é pouco freqüente. A prevalência de transmissão da mãe para a criança é menor que 6% e o risco de transmissão parece ser muito maior em mulheres com altos níveis de viremia ou co-infecção com HIV (EASL, 1999; Roberts e Yeung, 2002).

A prevalência da infecção pelo VHC varia em diferentes populações, oscilando entre 0,6% em doadores voluntários de sangue a 80% em usuários de drogas injetáveis. A freqüência do VHC na população pode ser estimada pelos fatores de riscos associados com a transmissão da infecção. Estes riscos incluem uso de drogas injetáveis, transfusão de hemoderivados, transplante de órgãos, hemodiálise, transmissão sexual e vertical (Yen, Keeffe, Ahmed, 2003).

Dados atualizados da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram baixas estimativas na prevalência da positividade do anti-HCV no Oeste Europeu, América do Norte e Austrália. Freqüências maiores foram encontradas em países da África, Ásia e América do Sul. A maior freqüência relatada foi no Egito (variando de 17 a 26%) (WHO, 2000).

Considerando a variação geográfica e temporal na incidência e prevalência da infecção pelo VHC e, utilizando dados de prevalência idadeespecífica, podemos identificar pelo menos três padrões distintos de transmissão. Em países com o primeiro padrão (EUA e Austrália), a maioria das infecções é encontrada em indivíduos com idade entre 30 e 49 anos, indicando que o risco para infecção pelo VHC foi maior num passado recente (10 a 30 anos atrás) e afetou principalmente adultos jovens. Em países com o segundo padrão (Japão e Itália), a maioria das infecções é encontrada em indivíduos, sendo compatível com um risco de infecção para o VHC muito maior num passado distante (30 a 50 anos atrás). Em países com o terceiro padrão, como o Egito, são observadas altas taxas de infecção em todos os grupos etários, indicando alto risco atual para a aquisição da infecção pelo VHC (Wasley e Alter, 2000).

Analisando a população do município de São Paulo, Focaccia et al. (1998) estimaram a prevalência da infecção pelo VHC em 1,4%, variando de 0,7 a 2,12%, conforme faixa etária, região geográfica e características sócio-econômicas. Modelos matemáticos baseados em levantamentos de uma população soro-prevalente e incidência idade-específica projetam que a mortalidade por cirrose e CHC relacionada ao VHC dobrará ou triplicará nas próximas duas décadas (Armstrong et al., 2000).

Existe acentuada heterogeneidade na distribuição geográfica dos genótipos do VHC em todo o mundo. Diferentes genótipos têm sido relacionados a distintos resultados clínicos e diferenças na susceptibilidade do vírus ao tratamento, evidenciando que a identificação do genótipo e de seus subtipos é útil para a compreensão da epidemiologia molecular e da patogênese da infecção pelo VHC (Di Bisceglie, 1998; Busek e Oliveira, 2003).

Estudos recentes, analisando a distribuição das freqüências genotípicas do VHC entre diferentes grupos, revelaram que a mesma difere nas diversas regiões brasileiras. As freqüências dos genótipos do VHC foram de 64,9% para o tipo 1, 4,6% para o 2, 30,2% para o 3, 0,2% para o 4 e 0,1% para o 5. Nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, o genótipo 1 foi o mais freqüente seguido pelos genótipos 3 e 2. Na região Sul, o genótipo 3 foi o mais freqüente seguido pelo genótipo 1. Uma maior prevalência isolada do genótipo 3 foi observada no estado do Ceará (região Nordeste). Os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados e somente na região Sudeste (Campiotto et al., 2005; Busek e Oliveira, 2003).

Bassit et al. (1999) avaliaram a distribuição e prevalência do genótipo do VHC numa população heterogênea de São Paulo, sendo que as maiores prevalências foram as dos genótipos 1 (63%), 2 (4,2%) e 3 (31,3%).

Além disso, identificou-se o genótipo 4 subtipo a (4a), ainda não descrito no Brasil e, recentemente, outros autores descreveram o genótipo 5, incomum na população brasileira (Levi et al., 2002).

A meta de tratamento para pacientes sem terapia prévia é a erradicação da carga viral, prevenção e ou também a regressão da fibrose hepática e a prevenção do carcinoma hepatocelular. Resposta virológica sustentada (RVS) constitui ausência de viremia após 6 meses da interrupção do tratamento e é análoga à cura. A viremia está relacionada à detecção do VHC por PCR nos hepatócitos (Reddy, 2001).

Esquemas baseados na utilização do INF- $\alpha$  têm sido a terapia de escolha para hepatite C pela constatação, desde o final da década de 80, de seus efeitos benéficos (Hoofnagle et al., 1986; Carithers e Emerson, 1997).

Os INFs são proteínas de ocorrência natural que compõem o sistema imune. São potentes citocinas divididas em dois tipos, I e II. O tipo I inclui o INF- $\alpha$  e o INF- $\beta$ , e o tipo II inclui o INF- $\gamma$ . Agem como mediadores intercelulares, os quais desempenham importante papel imunomodulador e interferem com mecanismos fisiopatológicos bastante diversos. Os INFs são produzidos e secretados por diferentes tipos celulares, incluindo linfócitos, fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares e células epiteliais. Estas células são induzidas a liberar INFs por uma variedade de estímulos, tais como: ácidos nucléicos, células neoplásicas e antígenos estranhos, encontrados
respectivamente nas células infectadas por vírus, nos cânceres e nos produtos bacterianos (Kalvakolanu e Borden, 1996; Stark et al., 1998).

Os INFs atuam ligando-se a receptores específicos na superfície celular e iniciam uma cascata completa de interações proteínaproteína levando à ativação rápida da transcrição do gene. Os efeitos desta modulação gene interferon-estimulado dependem do sistema biológico e podem resultar na inibição da replicação viral, inibição da proliferação celular e imunorregulação (PEGASYS<sup>®</sup>, 2002; PEGINTRON<sup>®</sup>, 2003).

A monoterapia com INF- $\alpha$  proporciona RVS em apenas 15 a 20% dos pacientes. Desde 1998, a ribavirina, um análogo sintético da guanosina que possui amplo espectro de ação contra ambos DNA e RNA vírus "in vitro" e "in vivo", tem sido avaliada em combinação com o INF $\alpha$ , melhorando sensivelmente a RVS. A combinação de ribavirina com o INF- $\alpha$  apresenta efeitos antivirais sinérgicos, porém não na fase inicial do tratamento (Dusheiko et al., 1996; Gutfreund e Bain, 2000). A terapia combinada com ribavirina tem demonstrado aumentar os níveis de RVS de 15 a 20% para 40% em pacientes sem tratamento prévio, e 50% para pacientes que recaíram após monoterapia com INF- $\alpha$  (Davis et al., 1998; McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Reichard et al., 1998; Pianko e McHutchison, 2000; Zeuzen, 2000).

O avanço terapêutico mais importante dos últimos anos foi a introdução do interferon peguilado (PEG-INF). A peguilação da molécula de interferon aumenta seu tamanho, tornando sua absorção mais lenta e sua

meia vida mais longa, e as taxas de depuração do plasma são mais lentas que a do INF padrão. Sua utilização combinada com a ribavirina tem aumentado significativamente as taxas de RVS em pacientes com hepatite C crônica, tornando-se atualmente o tratamento padrão para pacientes com HVC crônica sem tratamento prévio, incluindo aqueles com genótipo 1 e alta carga viral (Karnan e Reddy, 2003; Keeffe, 2003).

Os fatores que podem influenciar no sucesso desta combinação terapêutica são: genótipo, carga viral, presença de fibrose ou inflamação na biópsia hepática e peso ou área de superfície corporal (Baker, 2003; Karnan e Reddy, 2003).

Recentemente, vários estudos têm sido publicados demonstrando os benefícios da terapia combinada do PEG-INF com a ribavirina. Num consenso quase geral, têm-se evidenciado que a taxa global de RVS com estes regimes é de 54 a 61% com seguimento de 48 semanas de tratamento (Manns et al., 2001; Di Bisceglie e Hoofnagle, 2002; Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2002; Craxi e Licata, 2003).

Na versão final do documento elaborado no NIH (2002) sobre o tratamento da HVC consta que pacientes com genótipos 2 e 3 apresentaram RVS com o INF padrão associado a ribavirina compatíveis àquelas com PEG-INF e ribavirina e, portanto, este esquema terapêutico pode ser utilizado no tratamento de pacientes com esses genótipos.

#### 2. O Sistema IGF

O sistema IGF é talvez o mais complexo dos sistemas endócrinos. Os fatores de crescimento insulina-símile (IGFs) são componentes essenciais deste sistema múltiplo que controla o crescimento e o metabolismo.

A família IGF é formada por três ligantes (IGF-I, IGF-II e insulina), seis proteínas de ligação bem caracterizadas (IGFBP1 a IGFBP6) e receptores de superfície celular que medeiam as ações dos ligantes (IGF-IR, IR e M-6-P-R) (Nissley e Lopaczynsky, 1991; Jones e Clemmons, 1995; Le Roith et al., 1995).

Os IGFs, suas proteínas ligantes (IGFBPs) e receptores (IGF-Rs) são expressos em diferentes tipos de tecidos, no entanto, o fígado é considerado o principal órgão produtor de IGFs (Le Roith et al., 1991) o que determina que o conteúdo de mRNA de seu receptor IGF-I (IGF-IR) se apresente indetectável. Este padrão de expressão pode ser parcialmente explicado pela infra-regulação ("down-regulation") do gene do receptor pelo IGF-I produzido localmente (Werner, 1999).

Os IGF-I e II são pequenos peptídeos de cadeia simples de 70 e 67 aminoácidos respectivamente, peso molecular de 7,5 kDa, estruturalmente relacionados à pró-insulina, sendo suas ações biológicas mediadas por receptores específicos (Rotwein, 1999).

Os conhecimentos relativos à regulação do eixo somatotrófico vêm sendo ampliados ao longo do tempo. A hipótese original proposta há

mais de 50 anos, postulava que o GH controlava o crescimento das células somáticas estimulando o fígado a produzir uma substância circulante que agia de forma endócrina nos tecidos periféricos. Inicialmente, esta substância foi denominada de somatomedina e, posteriormente, de IGF-I.

Na década de 80, após a constatação de que o IGF-I era expresso por quase todos tecidos do organismo, uma visão alternativa que envolvia os efeitos diretos do GH nos tecidos periféricos não mediados pelo IGF-I e a produção local de IGF-I após estímulo do GH levaram a modificação da hipótese anterior, atribuindo-se assim um papel autócrino/ parácrino ao IGF-I (Le Roith et al., 2001).

Evidências atuais sugerem que a situação é mais complexa do que cada uma destas hipóteses. Experimentos recentes, realizados em animais com "knock-out" específico para o gene do IGF-I no fígado, têm questionado o papel deste IGF-I e as formas ligadas do IGF-I circulante controlando o crescimento e o desenvolvimento pós-natal. Os resultados destes estudos demonstram crescimento e desenvolvimento praticamente normais destes animais, apesar de acentuada redução do IGF-I total circulante e de sua principal proteína de ligação, a IGFBP3, associada a elevadas concentrações de GH. As concentrações de IGF-I livre são aparentemente normais e podem estar envolvidas neste processo juntamente com o efeito autócrino/parácrino do IGF-I. A fonte deste IGF-I livre ainda é indeterminada (Sjögren et al., 1999; Le Roith et al., 2001).

As ações biológicas dos fatores de crescimento insulina-símile (IGF-I e II) são mediadas por ativação de seus receptores. Estes formam uma sub-família de receptores tirosino-cinase, os quais são amplas proteínas transmembrânicas, constituídas de vários domínios estruturais (Ward et al., 2001).

O receptor de IGF-I e insulina são estruturalmente muito similares e apresentam aproximadamente 60% de homologia em suas seqüências de aminoácidos. No entanto, certas regiões destes receptores compartilham alto grau de homologia, incluindo o domínio tirosino-cinase, o qual mostra cerca de 85% de homologia entre os dois receptores. Ambos são formados por subunidades  $\alpha$ , extracelular e  $\beta$ , transmembrânica e intracelular (Steele-Perkins et al., 1988).

O receptor de IGF-II é uma proteína monomérica que possui três regiões de ligações localizadas no domínio extracelular, uma para o IGF-II e duas para moléculas ligantes que contenham manose-6-fosfato (M-6-P). Por apresentar esta característica bifuncional, o IGF-IIR também é denominado receptor IGF-II/M-6-P. O IGF-IIR não tem atividade tirosinocinase e parece atuar como um fator de depuração para o IGF-II. A ligação do IGF-II ao seu receptor resulta na internalização e degradação do IGF-II ligado à superfície celular, sendo assim, o IGF-IIR atuaria como um antagonista para o IGF-II, reduzindo suas atividades biológicas. Este fato influencia de maneira negativa na proliferação celular, reduzindo as concentrações de IGF-II disponíveis para se ligar ao IGF-IR. Devido este efeito, o IGF-IIR tem sido considerado uma molécula supressora de tumor (Nielsen, 1992; Oates et al., 1998; Kiess, 1999; Nissley, 1999; Pollak, Schernhammer, Hankinson, 2004). O IGF-IR, um heterotetrâmero transmembrânico amplamente expresso em muitos tipos celulares e em tecido fetal e pós-natal, liga-se ao IGF-I com alta afinidade e ao IGF-II com menor afinidade. Este receptor está ligado às cascatas de sinais transducionais, RAS-RAF-MAPK e PI3K-PKB/ AKT. Sua ativação leva a uma série de respostas celulares, proliferativa e anti-apoptótica, e é um pré-requisito para transformação oncogênica. Sob condições fisiológicas, a expressão do IGF-IR está sob controle inibitório de um grupo de reguladores negativos de crescimento ou supressores tumorais (Werner, 1999; Werner e Robert, 2003).

A superexpressão do IGF-IR resulta na transformação celular "in vitro". Inversamente, baixos níveis de IGF-IR podem reverter o fenótipo transformado das células tumorais, podendo torná-las mais sensíveis a apoptose. Níveis elevados de IGF-IR são observados numa variedade de tipos de tumores humanos, e estudos epidemiológicos apontam o eixo IGF-I como um fator predisponente na patogênese do câncer humano de pulmão e próstata (Adams et al., 2000).

# 3. O Sistema IGF e o Sistema Imune

Nos últimos anos, tem se tornado evidente que a regulação do sistema imune pelo sistema endócrino ocorre principalmente pelas interações autócrinas e parácrinas entre fatores de crescimento e citocinas. Estudos têm demonstrado que a expressão do IGF-I no sistema imune é regulada por citocinas, tais como a interleucina 1 (IL-1) e o INF- $\gamma$  (van Buul-Offers e Kooijman, 1998; Heesmkerk, Daemen, Buurman, 1999).

Vários estudos mostram que células imunocompetentes sintetizam e expressam GH, GHR, IGF-I, IGF-IR e diferentes tipos de IGFBPs (Kooijman et al., 1992; Xu et al., 1995; Geffner, 1997).

"In vitro", parece que o GH e o IGF-I são necessários para certas funções celulares, como maturação de linfócitos T e B, quimiotaxia e produção de anions superóxidos (Rapaport e Bozzola, 1997).

Os efeitos do IGF-I na imunidade adquirida são claramente refletidos por sua capacidade de regular a linfopoese antes e após a migração das células da medula óssea para os órgãos linfóides secundários (Geffner, 1997).

Como sugerido em vários estudos "in vitro", a regulação da imunidade inata por interações de células imunocompetentes com o IGF-I também pode afetar a responsividade das células imune maduras, uma vez que concentrações alteradas de IGF-I no curso das reações imunes e inflamatórias podem atuar de forma favorável ou dificultar a imunidade inata. Estes possíveis mecanismos podem ser evidenciados pelo enriquecimento de células NK por estímulo do IGF-I, pela produção de anions superóxidos iniciados pelo IGF-I em macrófagos e neutrófilos, ou pelo efeito estimulatório direto do IGF-I, em concentrações fisiológicas, na produção da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos e monócitos. Este efeito é mediado via IGF-IR e envolve a ativação tirosinocinase (Edwards et al., 1988; Kooijman et al., 1992; Renier et al., 1996).

Alguns autores têm investigado o papel do IGF-IR em células mononucleares. Os resultados mostram que o IGF-IR é detectado numa ampla variedade de células imunes e geralmente observado após estímulo com diferentes mitógenos. Conforme os relatos, a expressão do IGF-IR é maior em monócitos, seguidos por células NK, células CD4+, células CD8+ e linfócitos B. Observando a população de linfócitos T, os resultados evidenciam que as células CD8+ expressam IGF-IR com menor afinidade que as células CD4+. Estes resultados associados aos obtidos por Xu et al. (1995), que demonstraram o aumento da expressão do IGF-IR juntamente com a interleucina 2 (IL-2) nos linfócitos T ativados, indicam o possível papel do IGF-I e seu receptor nos mecanismos imunorregulatórios, atuando diretamente nos monócitos e nos linfócitos T e B (Kooijman et al., 1992).

Recentes estudos mostraram que o IGF-I exerce papel importante na maturação dos linfócitos da medula óssea e auxilia em suas funções periféricas. Em roedores, o tratamento com IGF-I pôde restaurar o timo da involução senil, aumentar o número e atividade dos linfócitos, melhorar a resposta dos anticorpos aos antígenos e acelerar a reconstituição linfóide após radiação e transplante de medula óssea. O IGF-I deve, portanto, agir nos tecidos linfóides pelos seus potentes efeitos antiapoptóticos (Clarck, 1997).

Numa abordagem mais recente, Auernhammer et al. (2002) avaliaram o envolvimento do IGF-I e de suas proteínas de ligação em células mononucleares de sangue periférico. Os resultados deste estudo evidenciam que a secreção das IGFBPs por MNC é regulada de forma distinta por mitógenos linfocitários diferentes, sendo que pelo menos três tipos de IGFBPs são secretadas por estas células quando estimuladas. Linfócitos T expressam mais IGFBP3, 2 e 4, nesta ordem, enquanto que linfócitos B apresentam discreta expressão de IGFBP4. A secreção de IGFBPs por células mononucleares foi considerada não ser dependente do GH ou do IGF-I, enquanto que a secreção de IGF-I mostrou ser regulada pelo GH.

## 4. O Sistema IGF e as Doenças Hepáticas

A estreita relação entre o fígado e o sistema endócrino é evidenciada pelo papel do fígado na inativação hormonal, síntese de fatores de crescimento e de proteínas ligantes de hormônios. Assim, danos na função dos hepatócitos poderiam levar a distúrbios na homeostase do sistema endócrino (Marek et al., 2001).

Em pacientes com cirrose hepática, a síntese e secreção de vários hormônios que controlam o metabolismo intermediário, incluindo insulina, glucagon, fator de crescimento insulina-símile tipo I (IGF-I), hormônio de crescimento (GH), hormônios da tireóide, cortisol e catecolaminas estão alteradas. Além disso, estudos evidenciam que transtornos no eixo GH-IGF-I em doenças hepáticas determinam pior prognóstico ao paciente cirrótico com má nutrição (Blömsma et al., 1997).

Uma série de estudos vem sendo realizada nesta área, desde que Wu et al. (1988) demonstraram que as concentrações de IGF-I e IGF-II circulantes estão diminuídas em doenças hepáticas.

Vários pesquisadores têm demonstrado que o IGF-I e a IGFBP3 representam bons preditores de sobrevida e devem ser utilizados como marcadores precoces de disfunção hepática em pacientes com hepatite crônica severa ou cirrose hepática, uma vez que estes pacientes apresentam baixas concentrações de IGF-I e IGFBP3 circulantes e estas se correlacionam de forma significativa com o grau de disfunção hepática (Möller et al., 1996; Caregaro et al., 1997; Holt et al., 1997; Lou et al., 2001; Donaghy et al., 2002).

Mazziotti et al. (2002) realizaram um estudo prospectivo e demonstraram que em pacientes com cirrose, relacionada ao VHC, o desenvolvimento do CHC é acompanhado por uma redução significativa das concentrações séricas de IGF-I independente do grau de deterioração da função hepática, concluindo que modificações nas concentrações de IGF-I precedem o advento do CHC, permitindo um diagnóstico mais precoce do tumor. Este achado reforça a utilização do IGF-I como marcador da capacidade hepatocelular funcional e pode ser útil para um prognóstico mais preciso em pacientes com doença hepática crônica.

O papel do IGF-I em doenças hepáticas bem como no desenvolvimento e progressão do CHC permanece incerto (Price et al., 2002). Enquanto tem sido relatado um aumento da expressão do IGF-IR durante a progressão focal pré-neoplásica hepática para o CHC, estudos

utilizando células de CHC cultivadas mostram uma falha do IGF-I em estimular a mitogênese (Zindy et al., 1992; Yau et al., 1999; Scharf, Dombrowski, Radamori, 2001; Price et al., 2002). Por outro lado, a superexpressão do gene do IGF-II tem sido descrita em modelos animais de hepatocarcinogênese (Norstedt et al., 1988; Harris, Rogler, Rogler, 1998) bem como em cirrose e CHC relacionados ao VHC em humanos (Cariani et al., 1988; Sohda et al., 1996; Fan et al., 2001; Scharf e Braulke, 2003; Sedlaczek et al., 2003).

Del Monte et al. (1995) avaliaram endocrinologicamente pacientes com hepatite C tratados com INF- $\alpha$ . Curiosamente, um aumento significativo na concentração do IGF-I, normalmente reduzida nas doenças hepáticas crônicas, foi observado durante o tratamento com INF- $\alpha$ . Sendo assim, o aumento observado durante o tratamento pode ser o reflexo da melhora da doença hepática, porém um efeito estimulador do INF- $\alpha$  sobre o IGF-I não pode ser descartado. Estes dados sugerem que a determinação plasmática de IGF-I pode ser útil na avaliação da resposta terapêutica ao INF- $\alpha$ .

Estudo realizado por Oliveira et al. (2001) em nosso laboratório mostrou que o conteúdo de mRNA do IGF-IR em linfócitos circulantes de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) tratados com INF- $\alpha$  encontrava-se aumentado, refletindo, talvez, o grau de ativação das células imunocompetentes no reconhecimento do clone de células malignas. Como a terapêutica preconizada para o tratamento da HVC inclui o INF- $\alpha$ , é possível que fenômenos semelhantes poderiam estar envolvidos no mecanismo de ação do INF- $\alpha$  na hepatite C.

À luz destas evidências, aventamos a hipótese que o comprometimento da função hepática determinado pela infecção com vírus da hepatite C ou, também, seu tratamento acarretariam alterações nos componentes do sistema IGF.

II. OBJETIVOS

**II. OBJETIVOS** 

A presente investigação teve por objetivo primário estudar a participação de alguns componentes do sistema IGF na hepatite por vírus C nos períodos pré e pós-tratamento com INF- $\alpha$  e ribavirina. Para tanto, foram estudados:

- As concentrações plasmáticas de IGF-I, total e livre, IGFBP2 e IGFBP3 nos períodos pré e pós-tratamento.
- O conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em amostras de tecido hepático obtidas por punçãobiópsia com agulha fina de pacientes portadores de hepatite C crônica nos períodos pré e pós-tratamento.

- O conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos T e B circulantes de pacientes portadores de hepatite C crônica nos períodos pré e pós-tratamento.
- A correlação destes resultados com os achados anatomopatológicos, bioquímicos e com o tipo de resposta obtida pela terapia.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

# **III. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

# CASUÍSTICA

A amostra inicial foi constituída por 80 pacientes matriculados no Ambulatório do Serviço de Cirurgia Experimental (A1CH) - Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado - LIM/37 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo 48 (60%) do sexo masculino e 32 (40%) do sexo feminino, com mediana da idade de 40 anos. Os dados demográficos destes pacientes são apresentados na Tabela 1.

Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios clínico-laboratoriais para o diagnóstico de hepatite por vírus C e, posteriormente, encaminhados para acompanhamento ambulatorial pela equipe médica da Disciplina de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas - FMUSP. Não foram incluídos pacientes já submetidos a tratamentos prévios com INF- $\alpha$  e ribavirina.

	Variáveis	Total
Dados demográficos	Sexo (F/M)	32/48
	Idade [mediana (min-max)]	40 (17-72)
	Peso (kg)*	73,4±1,86
	Altura (m)*	1,69±0,01
	IMC*	25,5±0,44

 
 Tabela 1.
 Dados demográficos dos pacientes portadores do VHC prétratamento

\*Os valores expressam Média  $\pm$  EPM

Todos os pacientes ou seus representantes legais foram devidamente informados quanto ao objetivo da pesquisa, dos riscos envolvidos e dos benefícios advindos de seu resultado. Os que concordaram, assinaram o Consentimento Pós-informação de acordo com as normas aprovadas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo 587/00.

As amostras coletadas constituíram-se de tecido hepático, obtido por biópsia, e sangue venoso periférico, pré e pós-tratamento. As amostras para biópsia hepática foram obtidas no período pré-tratamento de todos os pacientes selecionados, enquanto que as amostras de sangue venoso só foram coletadas após a indicação do tratamento. A primeira coleta foi realizada antes da administração da primeira dose do INF- $\alpha$  e da ribavirina e as coletas subseqüentes realizadas mensalmente nos intervalos correspondentes aos utilizados rotineiramente pela equipe clínica na avaliação histológica e bioquímica da resposta ao tratamento.

Dos 80 pacientes que constituíam a amostra inicial, 39 iniciaram tratamento com INF- $\alpha$  e ribavirina, conforme protocolo estabelecido pela equipe clínica. Quatro pacientes foram excluídos durante o curso do tratamento, sendo 2 por óbito e 2 por transtorno depressivo grave com ideação suicida. Dos 35 pacientes que concluíram o tratamento, 18

apresentaram resposta virológica ao final do tratamento. Destes, 15 pacientes (43%) obtiveram RVS.

Dos 41 pacientes que não foram tratados, 16 foram excluídos por não se enquadrarem nos critérios de indicação à terapia, sendo que 4 pacientes apresentavam outra doença associada a HVC que contra-indicava o tratamento e 12 pacientes foram excluídos com base nos resultados das biópsias hepáticas que indicavam "Fígado com padrão reacional em portador do VHC", os quais não têm indicação de tratamento. Apesar dos 25 pacientes restantes terem indicação de tratamento, 4 optaram por não tratar, 5 preferiram aguardar a liberação do PEG-INF pela Secretaria de Saúde, 8 pacientes foram tratados em outros centros e 8 não retornaram à consulta no período em que o estudo foi realizado.

# MÉTODOS

# 1. Protocolo Clínico

Todos os pacientes foram selecionados de acordo com as recomendações para o tratamento da hepatite viral tipo C preconizadas pelo Ministério da Saúde, associando-se ribavirina e interferon nas seguintes posologias: INF- $\alpha$  na dose de 3 milhões de unidades S.C., 3 vezes por semana, e ribavirina na dose de 1.000 mg/dia para pacientes com menos de 75 kg e 1.200 mg/dia para aqueles com peso maior que 75 kg. O tempo de tratamento dependeu da resposta terapêutica de cada paciente.

## 2. Processamento do Sangue Periférico

Dos pacientes que iniciaram tratamento foram coletados 40 mL de sangue periférico em heparina (5.000 UI/mL), 1 tubo de ensaio sem anticoagulante e outro com EDTA. Estes tubos foram encaminhados ao Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25 - HC-FMUSP). Dos tubos secos e com EDTA foram separados o soro e o plasma respectivamente, e congelados a -20 °C para as determinações quantitativas do hGH, IGF-I total e livre, IGFBP2 e IGFBP3. Dos 40 mL de sangue coletados com heparina, foram isoladas as células T e B, conforme método descrito a seguir. Após a separação, os linfócitos T e B, ressuspensos em 1,0 mL de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies), foram armazenados a -80 °C para posterior extração do RNA total e avaliação da expressão dos genes do IGF-I e IGF-IR pela técnica de RT-PCR semiquantitativa.

#### 2.1. Determinações Bioquímicas

Para as determinações de Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT) foram utilizados métodos cinéticos, segundo recomendações da "International Federation of Clinical Chemistry"; para a Gama Glutamil Transferase (GGT), o método cinético com L-g-Glutamil-4-Nitranilida, e para a Fosfatase Alcalina (FA), o método colorimétrico optimizado de acordo com as recomendações da "Deutsche Gesellchaft für Klinische Chemie".

As determinações da glicose plasmática e albumina sérica foram realizadas por métodos Enzimáticos Colorimétricos Automatizados.

As concentrações plasmáticas de hGH, IGF-I total e livre, IGFBP2 e IGFBP3 das amostras armazenadas a -20 °C foram determinadas com conjuntos diagnósticos compostos por reagentes adquiridos comercialmente:

> hGH: realizada por método de Quimioluminescência (PerkinElmer Life Science. Turku, Finlândia). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 3,9 e 3,7%, respectivamente. A dose mínima detectável foi

de 0,01 ng/mL e a dose efetiva de 50% (ED<sub>50</sub>) para o ensaio de 1,47 ng/mL.

- IGF-I Total: realizada por método imunorradiométrico (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Webster, E.U.A.). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 3,4 e 8,2%, respectivamente. A dose mínima detectável foi de 0,80 ng/mL e a ED<sub>50</sub> para o ensaio de 231 ng/mL.
- IGF-I Livre: realizada por método imunorradiométrico (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Webster, E.U.A.). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 10,3 e 7,7%, respectivamente. A dose mínima detectável foi de 0,03 ng/mL e a ED<sub>50</sub> para o ensaio de 7,03 ng/mL.
- IGFBP2: realizada por método imunorradiométrico (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Webster, E.U.A.). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 8,5 e 7,4%, respectivamente. A dose mínima detectável foi de 0,5 ng/mL e a ED<sub>50</sub> para o ensaio de 20,56 ng/mL.

 IGFBP3: realizada por método imunorradiométrico (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Webster, E.U.A.). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 3,9 e 0,6%, respectivamente. A dose mínima detectável foi de 0,5 µg/mL e a ED<sub>50</sub> para o ensaio de 5,68 µg/mL.

Alguns valores obtidos foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.), valor real obtido dividido pelo valor máximo de referência, para evitarmos variações entre os métodos, exceto para os valores da carga viral.

# 2.2. Separação Negativa das Células B ["B Cell Negative Isolation Kit" (Dynal AS. Oslo, Noruega)].

## 2.2.1. Preparação das Células Mononucleares (MNC)

Para este experimento foram utilizadas as amostras de sangue periférico coletadas em heparina (5.000 UI/mL) (Liquemine-Roche) dos pacientes portadores de HVC que iniciaram tratamento.

A primeira etapa do método consistiu na separação de células mononucleares por gradiente de densidade por Ficoll-Hypaque na densidade de 1.077 (GE Heathcare-Amersham plc. Buckinghamshire, UK).

O volume de sangue coletado foi diluído em solução salina na proporção de 1:3. Esta diluição foi distribuída com pipeta Pasteur em tubos de ensaio de 10 mL contendo aproximadamente 3 mL de Ficoll-Hypaque. Os mesmos foram centrifugados (Centrífuga Refrigerada Eppendorf 5810R. Hamburg, Alemanha) a 2.000 rpm, 30 min, 4 °C.

Após centrifugação, a interface, composta por células mononucleares, foi cuidadosamente removida com pipeta Pasteur e transferida para outro tubo. O volume foi completado para 10 mL com tampão fosfato salina com 0,1% de albumina sérica bovina (PBS/BSA 0,1%) e centrifugado a 1.300 rpm, 8 min, 4 °C.

O sobrenadante foi desprezado, ficando apenas o botão celular, que foi ressuspenso em 10 mL de PBS/BSA 0,1%. Este procedimento foi realizado 3 vezes e após a última lavagem, o botão celular

foi ressuspenso em 200  $\mu$ L de PBS/BSA 0,1%, e as células contadas em câmara de Neubauer.

# 2.2.2. Procedimento de Lavagem das Microesferas Magnéticas

As microesferas foram completamente ressuspensas e a quantidade desejada transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL. O tubo foi colocado no concentrador de partículas magnéticas (Dynal MPC) por 1 min. Após este período o fluído límpido foi pipetado cuidadosamente para não movimentar as microesferas.

O tubo foi retirado do dispositivo magnético e as microesferas ressuspensas em 1 mL de PBS/BSA 0,1%. O tubo foi novamente colocado no concentrador de partículas por 1 min, o tampão foi removido, o tubo retirado e as microesferas lavadas ressuspensas no volume original de tampão.

#### 2.2.3. Separação das Células B das MNC

Nesta etapa as MNC foram incubadas com a mistura de anticorpos e as microesferas de depleção adicionadas para remover as células indesejadas ligadas aos anticorpos.

Para cada  $10^7$  células MNC, utilizou-se 20 µL da mistura de anticorpos ("B Cell Kit") e 100 µL de microesferas de depleção conforme descrito abaixo:

As células, na concentração de  $10^7$ , foram ressuspensas em 100 µL de PBS/BSA 0,1% e incubadas com 20 µL da mistura de anticorpos por 10 min a -8 °C. Após este período, as células foram lavadas adicionando-se 1 mL de PBS/BSA 0,1% e centrifugadas por 8 min, 2.000 rpm. O sobrenadante foi removido com pipeta Pasteur, as células ressuspensas em 0,9 mL de PBS/BSA 0,1% e os 100 µL das microesferas previamente lavadas foram adicionados.

As células foram incubadas por 15 min em gelo, sob rotação e inclinação suaves. Em seguida, as rosetas (células ligadas as microesferas) foram cuidadosamente ressuspensas por pipetagem (5-6 vezes) antes de se completar o volume pela adição de PBS/BSA 0,1% até 1 mL.

O tubo foi transferido para o suporte Dynal MPC por 2 min e o sobrenadante, contendo as células B isoladas negativamente, transferido para um tubo novo. O mesmo foi centrifugado por 8 min, 2.000 rpm, 4 °C e o sobrenadante removido com pipeta Pasteur. O botão de células foi ressuspenso em 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies), agitado vigorosamente e mantido a -80 °C até seu posterior processamento.

# 2.3. Separação Negativa das Células T ["T Cell Negative Isolation Kit" (Dynal AS. Oslo, Noruega)].

As células T foram isoladas a partir de MNC inicialmente separadas, conforme metodologia anteriormente citada (item 4.1.1).

As microesferas magnéticas foram lavadas e ressuspensas de acordo com os procedimentos previamente mencionados.

## 2.3.1. Separação das Células T das MNC

Nesta etapa as MNC foram incubadas com a mistura de anticorpos e as microesferas de depleção adicionadas para remover as células indesejadas ligadas aos anticorpos.

Para cada 10<sup>7</sup> MNC, utilizou-se 20 μL da mistura de anticorpos ("T Cell Kit") e 100 μL de microesferas de depleção conforme descrito abaixo:

As células, na concentração de  $10^7$ , foram ressuspensas em 100 µL de PBS/BSA 0,1%, incubadas com 20 µL da mistura de anticorpos e 20 µL de soro fetal bovino por 10 min a -8 °C. Após este período, as células foram lavadas adicionando-se 1 mL de PBS/BSA 0,1% e centrifugadas por 8 min a 2.000 rpm. O sobrenadante foi removido com pipeta Pasteur e as células ressuspensas em 0,9 mL de PBS/BSA 0,1% e 100 µL de microesferas previamente lavadas foram adicionados.

As células foram incubadas por 15 min em gelo com rotação e inclinação suaves. Em seguida, as rosetas foram cuidadosamente ressuspensas por pipetagem (5-6 vezes) antes de se completar o volume pela adição de PBS/BSA 0,1% até 1 mL.

O tubo foi transferido para o suporte Dynal MPC por 2 min e o sobrenadante, contendo as células T isoladas negativamente, transferido para um tubo novo. O mesmo foi centrifugado por 8 min, 2.000 rpm, 4 °C e o sobrenadante removido com pipeta Pasteur. O botão de células foi ressuspenso em 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies), agitado vigorosamente e mantido a -80 °C até seu posterior processamento.

#### 3. Processamento do Tecido Hepático

De cada paciente, um fragmento de tecido hepático foi coletado por biópsia e posteriormente diviso em dois segmentos. Um foi imediatamente imerso em TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies. Carlsbad, E.U.A.), congelado em nitrogênio líquido, encaminhado ao Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25 - HC-FMUSP) devidamente identificado e armazenado a -80 °C até seu posterior processamento. O outro fragmento foi transferido para um tubo contendo solução de formol a 4% e encaminhado à Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas - FMUSP para análise histológica.

### 3.1. Histologia do Tecido Hepático

Os fragmentos fixados em formol foram emblocados em parafina, seccionados em cortes de 3 a 4 µm de espessura, sobrepostos em lâminas de vidro e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina. A análise histológica foi realizada por dois observadores independentes. O estadiamento foi determinado de acordo com os critérios atualmente adotados pelo Consenso Nacional sobre a Classificação de Hepatites Crônicas (Gayoto et al., 2000).

As características histopatológicas: fibrose, lesões necroinflamatórias no trato portal, hepatite de interface e lesões parenquimatosas foram graduadas atribuindo-se valores de 0 a 4. Zero representou ausência da variável estudada; 1, a intensidade mínima; 2 e 3, níveis intermediários, e 4, a máxima intensidade conhecida em hepatites crônicas.

Para a esteatose macro e microvesicular, a intensidade foi considerada tendo em vista o número de hepatócitos infiltrados em porcentagem: até 25%, grau 1; entre 26 e 50%, grau 2; entre 51 e 75%, grau 3 e entre 76 e 100%, grau 4. O sistema de gradação utilizado está representado na tabela 2.

# Tabela 2. Classificação e estadiamento das hepatites crônicas

VARIÁVEIS	GRAUS	CRITÉRIOS DE GRADAÇÃO
Alterações Estruturais	0 - 4	Intensidade e expansão fibrosa na arquitetura lobular.
Infiltrado Inflamatório Portal/ Septal	0 - 4	Quantidade de linfócitos.
Atividade Periportal/ Perisseptal	0 - 4	Intensidade e extensão de lesões na interface Espaço-porta/ Parênquima.
Atividade Parenquimatosa	0 - 4	Intensidade das lesões nos hepatócitos e extensão de áreas de necrose.
Marcadores Etiológicos:		
Agregados linfóides portais	0 - 4	Freqüência e quantidade de células.
Agressão ao epitélio dos ductos biliares.	0 - 4	Freqüência e extensão.
Esteatose	0 - 4	% de hepatócitos acometidos.

Obs.: **0**: ausência da variável estudada; **1**: presença da variável em intensidade mínima; **2**: nível intermediário inferior; **3**: nível intermediário superior; **4**: presença da variável na máxima intensidade conhecida dentro desta população.

## 3.2. Estudo Imuno-histoquímico para o IGF-IR

A análise imuno-histoquímica (IHQ) utilizada para a pesquisa do IGF-IR em tecido hepático foi realizada pelo método LSAB<sup>®</sup> - HRP [Large Volume DAKO LSAB<sup>®</sup> + Kit, Peroxidase (DAKO Corporation. Carpinteria, E.U.A.)].

Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram sobrepostos em lâminas silanizadas [3-Aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Co., St Louis, E.U.A.)] e seguiu-se o protocolo descrito abaixo.

#### 3.2.1. Desparafinação

O conjunto de lâminas silanizadas contendo os cortes de tecido hepático foi colocado em suporte adequado, posteriormente imerso em xilol e aquecido a 60-65 °C em estufa por 20 min. Após, as lâminas receberam 3 banhos de xilol frio por, aproximadamente, 1 min em cada banho.

#### 3.2.2. Hidratação

Após a fase de desparafinação, as lâminas foram hidratadas em banhos de álcool absoluto, 95° e 70° por 1 min. As mesmas foram lavadas em água corrente abundante, seguida de lavagem com água deionizada.

## 3.2.3. Bloqueio

Após a fase de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 10 Vol 3%, 7 vezes, 5 min cada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente abundante, seguida de lavagem com água deionizada e incubadas em tampão fosfato-salina (PBS).

## 3.2.4. Recuperação Antigênica

A recuperação antigênica foi obtida por alta temperatura em solução de EDTA 0,5 M, pH 8,0 por 30 min. Após este período, as lâminas imersas nesta solução foram resfriadas até a temperatura ambiente (TA) por 20 min e lavadas em PBS.

# 3.2.5. Incubação com o Anticorpo Primário (IGF-IR)

Previamente a incubação do anticorpo primário, foi realizado bloqueio de proteínas pelo reagente DAKO<sup>®</sup> Protein Block Serum - Free (DAKO Corporation) por 15 min, TA, seguida do bloqueio de biotinas pelo reagente DAKO<sup>®</sup> Biotin Blocking System (DAKO Corporation) por 15 min. Após os bloqueios, o anticorpo primário "mouse" monoclonal IGF-IR (α-Subunit) Ab-1 (Clone 24-31) (LAB VISION Corporation. Westinghouse, E.U.A.), título de 1:50 diluído em soro-albumina bovina (BSA) foi aplicado

sobre os cortes e controles, positivo e negativo de tecido, e as lâminas incubadas "overnight".

As lâminas então foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário e com o complexo estreptavidina-biotina [Kit LSAB<sup>®</sup> + HRP (DAKO Corporation)]. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e reveladas pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co.). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck. Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck).

A positividade para o anticorpo IGF-IR foi avaliada de forma semiquantitativa segundo a marcação presente nos ductos biliares interlobulares, linfócitos portais e lobulares, células de Kupffer, hepatócitos, células endoteliais e células ductais periportais (canal de Hering), seguindo a seguinte gradação: 0 = ausência de marcação, 1 = marcação escassa e 2 = marcação intensa.

Os procedimentos foram executados e os resultados liberados sob o parecer de um médico patologista com vasta experiência em patologia hepática.

## 4. Expressão Gênica

## 4.1. Extração do RNA Celular

O RNA total dos linfócitos T e B, mantido a -80 °C, foi extraído por TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies) (Chomczynski, 1993).

A suspensão de células foi descongelada e as células lisadas com auxílio de seringa e agulha de fino calibre. À solução, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio (Merck) e a mesma foi agitada vigorosamente por 15 s, seguido de incubação por 5 min a temperatura ambiente e centrifugada durante 15 min, 12.000 rpm a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL e o RNA foi precipitado com 500  $\mu$ L de isopropanol (Merck).

A mistura foi deixada em repouso durante 10 min e centrifugada por 15 min, 12.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o botão de RNA lavado com 1 mL de etanol (Merck) 70%, centrifugado novamente e ressuspenso em um volume apropriado de água estéril tratada previamente com dietilpirocarbonato de sódio [DEPC (Sigma Chemical Co.)] na concentração final de 0,01%.
### 4.2. Extração do RNA Tecidual

Para extração, o tecido hepático foi fragmentado em pulverizador de tecidos (Micro-Dismenbrenator II B. Braun Biotech International. Melsugen, Alemanha). Ao material pulverizado foi adicionado 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies) e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, seguiu-se o mesmo protocolo de extração utilizado para os linfócitos T e B, conforme anteriormente descrito.

### 4.3. Quantificação do RNA Total

A concentração do RNA total extraído foi determinada por espectrofotometria [GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)]. A estimativa da quantidade de RNA foi realizada medindo-se a absorbância a 260 nm e 280 nm, sendo a primeira leitura correspondente à quantidade de ácidos nucléicos (DNA, RNA) na amostra e a segunda à concentração protéica. A preparação do RNA foi considerada livre de proteínas quando a relação A<sub>260/280</sub> encontrava-se entre 1.8 e 2.0. Para as amostras que não atingiram estes valores, foram realizadas novas extrações com fenol-clorofórmio, a fim de remover as proteínas contaminantes. A concentração de RNA foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

Concentração de RNA (ng/mL) = A<sub>260</sub> x fator de diluição x coeficiente de extinção

O coeficiente de extinção utilizado foi de 40, isto é, uma unidade de densidade ótica (1 DO<sub>260 nm</sub>) corresponde a 40 mg de RNA por mL de solução examinada. O fator de diluição utilizado foi de 35 e as amostras foram quantificadas em cuvetas de quartzo de 10 mm com capacidade para 100  $\mu$ L de solução. Somente amostras com relação A<sub>260/280</sub> maior ou igual a 1.8 foram utilizadas. Os RNAs totais extraídos foram mantidos a -80 °C até sua utilização (Lasser, 1995).

### 4.4. Análise da Integridade do RNA Total

A integridade e pureza dos RNAs totais extraídos das amostras de tecido hepático e de linfócitos T e B, pré e pós-tratamento, foram analisadas em gel de agarose 1%. Amostras de 20 µg de RNA foram redissolvidas em tampão MOPS/formaldeído contendo 50% de formamida, 5% de azul de bromofenol e 5 mg/mL de brometo de etídeo e aquecidas a 90 °C por 2 min. As amostras assim tratadas foram submetidas à eletroforese a 80 V em tampão TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) por 45 min. Foram utilizadas somente as amostras cujas bandas correspondentes ao RNA ribossomal (rRNA) 18 e 28 S mostraram-se íntegras à analise sob luz ultravioleta (Delidw et al., 1993). A figura 1 ilustra a análise da integridade e pureza de alguns RNAs totais extraídos de tecido hepático.



Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando a integridade dos RNAs extraídos de tecido hepático com visualização das bandas 28 e 18 S.

## 4.5. Determinação Semiquantitativa da Expressão de mRNA dos Genes do IGF-I e do IGF-IR por RT-PCR

A expressão de mRNA foi avaliada pela técnica de RT-PCR semiquantitativa ("semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction"), na qual a transcrição reversa do RNA depende de uma primeira reação com a enzima transcriptase reversa (RT: "reverse transcriptase") e, posteriormente, da amplificação com iniciadores específicos para cada região de interesse por reação de polimerase em cadeia (PCR: "polymerase chain reaction").

### 4.6. Síntese do DNA Complementar (cDNA)

Três microgramas do RNA total, extraído de acordo com a técnica descrita anteriormente, foram utilizados na síntese de cDNA por ação da transcriptase reversa [Superscript II/ Rnase II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies)].

Resumidamente, o volume total de 20 µL compreendeu os seguintes reagentes: 3 µg de RNA total, 100 ng de hexanucleotídeos randômicos, 1x tampão da enzima, 0,01 M de ditiotreitol, 0,5 mM de cada um dos desoxinucleosídeos e 200 U de SuperScript II. A reação foi processada a 42 °C por 50 min e a 70 °C por 15 min no termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf AG. Hamburg, Alemanha).

A qualidade destas amostras foi mais uma vez verificada pela amplificação do gene BCR. Segundo comparações realizadas por Watzinger e Lion (1998), o gene constitutivo BCR é o mais indicado para verificar a qualidade do cDNA quando comparado com o ABL (Abelson), β2-MG (beta-2-microglobulina) e PBGD (porfobilinogênio desaminase), pois enquanto estes estavam expressos em cDNA de baixa qualidade, o sinal de amplificação do BCR desaparecia.

### 4.6.1. Curva de Aferição do Número de Ciclos para as RT-PCRs

As curvas de aferição das RT-PCRs foram obtidas por coamplificação do gene do BCR com os genes em estudo. Antes de estar disponível tecido hepático normal, a padronização do número de ciclos para co-amplificação do gene do IGF-I e do IGF-IR foi realizada em tecido placentário humano por expressar altos níveis de mRNA de IGF-I e de seu receptor. Além disso, a expressão do IGF-IR no fígado humano normal é muito baixa, de forma que não seria adequado para a padronização da técnica (Figura 2). Respeitando a fase exponencial da curva de amplificação da RT-PCR, o número de ciclos considerado ideal para o gene do IGF-I e o do IGF-IR no tecido placentário humano foi de 40 ciclos (Figuras 3 e 4). Para os linfócitos T e B, o número ideal de ciclos foi 35 para o gene do IGF-I (Figura 5) e 40 para o do IGF-IR.



PM: Marcador de peso molecular - 100 pb

- 1 : Fígado humano normal
- 2 : Fígado humano normal
- CN: Controle Negativo
- CP: Controle Positivo (Placenta humana)
- **Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNAs de IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) isolados de tecido hepático normal e amplificados por RT-PCR. Nota-se que o tecido hepático normal não expressa o gene para o IGF-IR, apenas o gene para o controle interno BCR.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNAs de IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) isolados de placenta humana e amplificados por RT-PCR em diferentes números de ciclos: 1: 25 ciclos, 2: 30 ciclos, 3: 35 ciclos, 4: 40 ciclos, 5: 45 ciclos, 6: 50 ciclos, 7: 55 ciclos, PM: Marcador de peso molecular - 100 pb e CN: Controle Negativo.



**Figura 4.** Curva de aferição do número de ciclos para a RT-PCR obtida por co-amplificação dos genes do IGF-IR e do BCR em tecido placentário humano.



**Figura 5.** Curva de aferição do número de ciclos para a RT-PCR obtida por co-amplificação dos genes do IGF-I e do BCR em linfócitos T e B.

### 4.6.2. Gradiente de Temperatura

A temperatura de "annealing" ideal para a co-amplificação dos genes do IGF-I e do IGF-IR com o gene do BCR foi determinada por gradiente de temperatura. Para este experimento, foi utilizado cDNA de tecido hepático humano normal obtido comercialmente [Human Liver Quick-Clone cDNA (Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA, EUA)], de placenta humana e de linfócitos T e B de indivíduos sadios. A reação de RT-PCR foi realizada no Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppenforf AG) em diferentes temperaturas de "annealing". A temperatura considerada ideal foi 57 °C para ambos os genes, tanto para os tecidos placentário (Figura 6) e hepático quanto para os linfócitos T e B.

Os mesmos experimentos foram realizados para a padronização da RT-PCR para os genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos T e B normais.



Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNAs de IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) isolados de placenta humana e amplificados por RT-PCR em diferentes temperaturas de "annealing": 1: 51,6 °C, 2: 52,7 °C, 3: 55,4 °C, 4: 56,8 °C, 5: 58,1 °C, 6: 59,2 °C e 7: 60,0 °C.

### 4.6.3. Reação de Co-amplificação dos Genes de Interesse

4.6.3.1. Tecido Hepático

A reação para amplificação dos genes de interesse foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 250 ng/ $\mu$ L de cDNA, 0,44  $\mu$ M de cada um dos amplímeros do gene do IGF-IR e 0,22  $\mu$ M para o controle interno (BCR), 0,22 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão termofílico 1x (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM TRIS-HCL) e 2 U de Taq DNA polimerase (GE Heathcare-Amersham plc).

O protocolo de amplificação utilizado foi realizado em termociclador (MJ Research INC - PerkinElmer Cetus. Emeryville, E.U.A.) e foi constituído de um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C, 2 min e 30 s e 40 ciclos de temperatura: 94 °C por 30 s (desnaturação), 57 °C por 1 min ("annealing") e 72 °C por 1 min e 30 s (extensão). Após os ciclos de amplificação, as amostras foram incubadas a 72 °C por 1 min e 30 s (alongamento).

Para a reação de amplificação do gene do IGF-I seguiu-se o mesmo protocolo, alterando-se para 0,22 µM as concentrações dos amplímeros para o gene do IGF-I e para 0,44 µM para o controle interno (BCR).

Sete microlitros do produto de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 100 V por aproximadamente 45 min, e as bandas foram visualizadas por luz ultravioleta (GelDoc 1000 Video Gel

Documentation System, BioRad Laboratories. Hercules, E.U.A.) (Figuras 7 e 8).

### 4.6.3.2. Linfócitos T e B

Para a reação de amplificação do gene do IGF-IR, utilizou-se o mesmo protocolo empregado para o tecido hepático, modificando-se as concentrações tanto dos amplímeros para o gene do IGF-IR quanto para o gene do controle interno (BCR) para 0,22 µM.

A reação de amplificação do gene do IGF-I em linfócitos T e B foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 250 ng/ $\mu$ L de cDNA, 0,44  $\mu$ M de cada um dos amplímeros para o gene IGF-I e 0,22  $\mu$ M para o controle interno (BCR), 0,22 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão termofílico 1x (600 mM TRIS-SO<sub>4</sub>, 180 mM de Sulfato de Amônia), 2 mM MgSO<sub>4</sub> e 2 U de Taq DNA polimerase [Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen Life Technologies)].

O protocolo de amplificação utilizado foi realizado em termociclador (MJ Research INC - PerkinElmer Cetus. Emeryville, E.U.A.) e foi constituído de um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C, 2 min e 35 ciclos de temperatura: 94 °C por 30 s (desnaturação), 57 °C por 30 s ("annealing") e 68 °C por 2 min (extensão). Após os ciclos de amplificação as amostras foram incubadas a 72 °C por 2 min (alongamento).



PM: Marcador de peso molecular - 100 pb

- 1 : Paciente 1
- 2 : Paciente 2
- 3 : Paciente 3
- **CN: Controle Negativo**
- CP: Controle Positivo Placenta humana
- **Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-I e BCR (303 pb e 377 pb) de cDNAs extraídos de tecido hepático dos pacientes 1, 2 e 3 (amostras em triplicatas).

# PM 1 1 1 2 2 2 3 3 3 CN CP

PM: Marcador de peso molecular - 100 pb

- 1 : Paciente 1
- 2 : Paciente 2
- 3 : Paciente 3
- **CN: Controle Negativo**
- CP: Controle Positivo Placenta humana
- **Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) de cDNAs extraídos de tecido hepático dos pacientes 1, 2 e 3 (amostras em triplicatas).

Sete microlitros do produto de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 100 V por aproximadamente 45 min, e as bandas foram visualizadas por luz ultravioleta (GelDoc 1000 Video Gel Documentation System (Figuras 9 e 10).

As expressões dos genes do IGF-I e do IGF-IR foram avaliadas pelo método descrito acima com o uso dos seguintes amplímeros:

(a) IGF-I

5'- TCT TGA AGG TGA AGA TGC ACA CCA -3' 5'- AGC GAG CTG ACT TGG CAG GCT TGA -3'

(b) IGF-IR

5'- ACC CGG AGT ACT TCA GCG CT -3'

5'- CAC AGA AGC TTC GTT GAG AA -3'

Os amplímeros para amplificação dos fragmentos do gene BCR (controle interno) (Watzinger e Lion, 1998) foram:

(c) BCR

5'-GAG AAG AGG GCG AAC AAG-3'

5'-CTC TGC TTA AAT CCA GTG GC-3'



PM: Marcador de peso molecular - 100 pb

- T : Linfócitos T
- B : Linfócitos B
- **CN: Controle Negativo**
- CP: Controle Positivo
- **Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-I e BCR (303 pb e 377 pb) de cDNAs extraídos de linfócitos T e B normais (amostras em triplicatas).



PM: Marcador de peso molecular - 100 pb

- T : Linfócitos T
- B : Linfócitos B
- **CN: Controle Negativo**
- **Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos amplificados por RT-PCR para os genes do IGF-IR e BCR (230 pb e 377 pb) de cDNAs extraídos de linfócitos T e B normais (amostras em triplicatas).

Evitou-se a amplificação de DNA genômico pela seleção de amplímeros em éxons diferentes.

O produto final da reação apresentou um fragmento de 303 pb dos éxons 1, 2 e 3 do gene do IGF-I (Figura 11) e um fragmento de 230 pb dos éxons 15 e 16 do gene do IGF-IR (Figura 12).

Para ambas reações, o comprimento do fragmento dos éxons 11 a 14 do gene do controle interno BCR foi de 377 pb (Figura 13).

A densidade das bandas correspondentes aos produtos de amplificação dos cDNA dos genes de interesse foram quantificadas por densitometria ótica (Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics. Sunnyvale, E.U.A.) e os valores expressos em unidades arbitrárias de densidade ótica (U.A.D.O.).

Para evitarmos variações intra e interensaio, todas as amostras do mesmo paciente foram amplificadas em triplicatas na mesma reação de RT-PCR e seus produtos submetidos à eletroforese no mesmo gel de agarose 2%. Para a análise da expressão de cada gene, utilizou-se a média dos valores das unidades arbitrárias obtidas por densitometria óptica das bandas de interesse.

	+10	+20	+30	+40	+50
1	TTCAGAGCAG	ATAGAGCCTG	CGCAATGGAA	TAAAGTCCTC	AAAATTGAAA
51	TGTGACATTG	CTCTCAACAT	CTCCCATCTC	TCTGGATTTC	TTTTTGCTTC
101	ATTATTCCTG	CTAACCAATT	CATTTTCAGA	CTTTGTACTT	CAGAAGCAAT
151	GGGAAAAATC	AGCAGTCTTC	CAACCCAATT	ATTTAAGTGC	TGCTTTTGTG
200	ATT <b>TCTTGAA</b>	GGTGAAGATG	<b>CACACCA</b> TGT	CCTCCTCGCA	TCTCTTCTAC
251	CTGGCGCTGT	GCCTGCTCAC	CTTCACCAGC	TCTGCCACGG	CTGGACCGGA
300	GACGCTCTGC	GGGGCTGAGC	TGGTGGATGC	TCTTCAGTTC	GTGTGTGGAG
351	ACAGGGGCTT	TTATTTCAAC	AAGCCCACAG	GGTATGGCTC	CAGCAGTCGG
400	AGGGCGCCTC	AGACAGGCAT	CGTGGATGAG	TGCTGCTTCC	GGAGCTGTGA
451	TCTAAGGAGG	CTGGAGATGT	ATTGCGCACC	CC <b>TCAAGCCT</b>	GCCAAGTCAG
501	<b>CTCGCT</b> CTGT	CCGTGCCCAG	CGCCACACCG	ACATGCCCAA	GACCCAGAAG

Figura 11. Seqüência de 550 pb dos éxons 1, 2 e 3 do gene do IGF-I. As regiões destacadas correspondem aos amplímeros positivo e negativo utilizados na RT-PCR. O produto final da RT-PCR apresenta 303 pb.

+50	+40	+30	+20	+10	
GTGA <b>ACCCGG</b>	GTATGCCTCT	ATGGAGTGCT	AGGCTGGGGA	AAATAACAGC	1
GGAGGTGGCT	CTGATGAGTG	GTGTACGTTC	<b>CGCT</b> GCTGAT	AGTACTTCAG	51
CGTTTGGGAT	GGGCAGGGGT	CCGGGAACTT	TCACCATGAG	CGGGAGAAGA	101
CCTGAAACCA	GAAAGATGAA	AGGGTGTGGT	GGAGTTGCCA	GGTCTATGAA	151
TGAGAGGATT	CAAGCATGCG	AACGAGGCCG	TAAAACAGTG	GAGTGGCCAT	201
GTCACCATGT	GAGTTCAATT	<b>TGTG</b> ATGAAG	ACGAAGCTTC	GAGT <b>TTCTCA</b>	251

- 301 G
- **Figura 12.** Seqüência de 301 pb dos éxons 15 e 16 do gene do IGF-IR. As regiões destacadas correspondem aos amplímeros positivo e negativo utilizados na RT-PCR. O produto final da RT-PCR apresenta 230 pb.

	+10	+20	+30	+40	+50
1	CAAAACGCAG	CAGTATGACT	GCAAATGGTA	CATTCCGCTC	ACGGATCTCA
51	GCTTCCAGAT	GGTGGATGAA	CTGGAGGCAG	TGCCCAACAT	CCCCCTGGTG
101	CCCGATGAGG	AGCTGGACGC	TTTGAAGATC	AAGATCTCCC	AGATCAAGAG
151	TGACATCCAG	AGA <b>GAGAAGA</b>	GGGCGAACAA	<b>G</b> GGCAGCAAG	GCTACGGAGA
201	GGCTGAAGAA	GAAGCTGTCG	GAGCAGGAGT	CACTGCTGCT	GCTTATGTCT
251	CCCAGCATGG	CCTTCAGGGT	GCACAGCCGC	AACGGCAAGA	GTTACACGTT
301	CCTGATCTCC	TCTGACTATG	AGCGTGCAGA	GTGGAGGGAG	AACATCCGGG
351	AGCAGCAGAA	GAAGTGTTTC	AGAAGCTTCT	CCCTGACATC	CGTGGAGCTG
401	CAGATGCTGA	CCAACTCGTG	TGTGAAACTC	CAGACTGTCC	ACAGCATTCC
451	GCTGACCATC	AATAAGGAAG	ATGATGAGTC	TCCGGGGCTC	TATGGGTTTC
501	TGAATGTCAT	CGTCCACTCA	GCCACTGGAT	TTAAGCAGAG	TTCAA

**Figura 13.** Seqüência de 545 pb dos éxons 10 a 14 do gene do controle interno BCR. As regiões destacadas correspondem aos amplímeros positivo e negativo utilizados na RT-PCR. O produto final da RT-PCR apresenta 377 pb.

### 5. Quantificação da Carga Viral

A determinação quantitativa do RNA do vírus da hepatite C foi realizada antes e durante o período de tratamento pela técnica de PCR Quantitativa [Teste Cobas Amplicor VHC Monitor<sup>™</sup>, versão 2.0 (Roche Molecular Systems. Pleasanton, CA, E.U.A.)]. Este teste baseia-se em 5 etapas principais: preparação da amostra, transcrição reversa do RNA-alvo para síntese do cDNA, amplificação do cDNA-alvo utilizando-se amplímeros específicos para o VHC, hibridização do DNA amplificado com sondas oligonucleotídicas específicas dos alvos e detecção do DNA amplificado fixo à sonda por determinação colorimétrica.

O padrão de quantificação foi incorporado a cada amostra individual em número de cópias conhecido. Este padrão foi utilizado em todos os passos da reação permitindo a amplificação simultânea do RNA padrão e RNA-alvo.

O analisador Cobas Amplicor calculou os níveis de RNA do VHC presente nas amostras-teste comparando seu sinal com o do padrão de quantificação de cada amostra. Reações com controles positivo e negativo, fornecidos pelo fabricante, foram efetuadas em paralelo. O limite de detecção do teste foi de 600 UI/mL.

### 6. Análise Estatística

Na comparação das variáveis dos grupos tratados e não tratados com os grupos com e sem RVS, utilizou-se a análise de variância para as comparações múltiplas suplementada pela prova de Student-Newman-Keuls. Na correlação entre as diferentes variáveis foi utilizada a prova de Spearman (SigmaStat<sup>®</sup> Version 3.0 - SPSS. Chicago, E.U.A.).

# IV. RESULTADOS

### **IV. RESULTADOS**

### 1. Análise da Função Hepática

Na Tabela 3 são apresentadas as médias dos valores das gradações das quatro variáveis das biópsias hepáticas, das cargas virais e das enzimas AST e ALT dos pacientes portadores do VHC pré-tratamento. Não foi analisada a distribuição genotípica do VHC nesta casuística devido ao pequeno número de pacientes que realizaram este exame.

Avaliando-se os resultados das enzimas AST e ALT nos períodos pré e pós-tratamento, foi observado que os mesmos foram estatisticamente diferentes entre os períodos (p<0,05), tanto para os pacientes que apresentaram RVS, quanto para aqueles que não apresentaram tal resposta. No grupo de pacientes com RVS, observou-se que a média dos níveis basais de AST foi menor quando comparada à do grupo de pacientes sem RVS (p<0,05) (Figura 14). **Tabela 3.**Perfil hepático e carga viral dos pacientes portadores do VHC.<br/>Amostragem inicial

	Variáveis	Média ± EPM
	Alterações estruturais	1,6±0,14
<b>Biónsia henática</b>	Infiltrado portal	2,2±0,10
	Infiltrado periportal	1,7±0,13
	Atividade parenquimatosa	1,7±0,08
Carga viral	Carga viral (UI/mL)	600,839±95,382
Aminotransferases	AST (U.A.)	1,8±0,16
Ammotiansierases	ALT (U.A.)	2,5±0,20



**Figura 14.** Representação gráfica das médias das U.A. (unidades arbitrárias) das enzimas AST e ALT dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento.

Observou-se uma diminuição nas médias dos escores das quatro variáveis das biópsias hepáticas entre os períodos pré (n=79) e póstratamento (n=16), tanto no grupo de pacientes com RVS quanto no grupo sem RVS, porém, a média dos escores da atividade parenquimatosa só foi significativamente menor (p<0,05) no período pós-tratamento em relação ao período pré-tratamento no grupo que não obteve RVS (Figura 15).

Quando as médias dos níveis das cargas virais dos períodos pré e pós-tratamento foram analisadas conjuntamente, evidenciou-se diferença significativa entre os grupos com e sem RVS (p<0,05). No entanto, não se observou diferença estatisticamente significativa nas médias dos níveis basais do período pré-tratamento nos grupos com e sem RVS separadamente (Figura 16).

As médias dos dados anatomopatológicos, das cargas virais, das concentrações plasmáticas de glicose, hGH, IGF-I (total e livre), IGFBP2 e IGFBP3, das concentrações séricas de albumina, ALT, AST, GGT, FA, bem como, do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em tecido hepático e em linfócitos T e B dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento, encontram-se na Tabela 4.



Figura 15. Representação gráfica das médias dos escores das variáveis das biópsias hepáticas dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento.



Figura 16. Representação gráfica das médias dos níveis das cargas virais, expressos em UI/ mL, dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento.

		Tratados			
	Variáveis	RVS(+)		RVS(-)	
		Basal	Pós-tratamento	Basal	Pós-tratamento
	Alterações estruturais	1,87±0,32	1,80±0,66	1,96±0,26	1,80±0,58
Riánsia honática	Infiltrado portal	2,40±0,19	2,00±0,00	2,58±0,15	2,00±0,32
Biopsia nepatica	Infiltrado periportal	1,80±0,28	1,20±0,37	2,29±0,19	1,80±0,49
	Atividade parenquimatosa	1,80±0,14	1,40±0,24	2,04±0,11	1,20±0,20
	Carga viral (UI/mL)	600,839±95,382	0±0	736,719±47,303	464,589±113,955
Dados laboratoriais	Albumina (g/dL)	4,2±0,16	4,1±0,24	4,3±0,11	4,1±0,16
	Glicemia plasmática (mg/dL)	89,3±3,05	86,3±4,71	95,3±4,41	90,3±6,24
Aminotransforação	AST (U.A.)	1,50±0,19	0,77±0,06	2,24±0,30	1,16±0,22
Ammouransierases	ALT (U.A.)	2,36±0,38	0,55±0,05	2,73±0,35	1,11±0,26
	hGH (ng/dL)	0,04±0,01	0,07±0,03	0,04±0,02	0,05±0,01
	IGF-I total (ng/dL)	302,2±36,89	287,4±43,63	248,8±27,05	215,9±26,84
Eixo GH/IGF-I/IGFBP	IGF-I livre (ng/dL)	3,13±0,88	2,43±0,74	0,89±0,20	1,24±0,46
	IGFBP3 (µg/dL)	3,35±0,32	3,60±0,41	2,64±0,21	2,61±0,18
	IGFBP2 (ng/dL)	9,9±1,53	13,7±2,77	9,9±0,73	12,0±1,12
Fígado	mRNA IGF-I (U.A.D.O.)	1,34±0,15	1,08±0,21	1,32±0,19	1,03±0,13
	mRNA IGF-IR (U.A.D.O.)	0,74±0,06	0,40±0,01	0,75±0,03	0,76±0,14
Linfócitos T	mRNA IGF-I (U.A.D.O.)	0,74±0,12	0,81±0,13	0,45±0,06	0,55±0,07
	mRNA IGF-IR (U.A.D.O.)	0,99±0,06	1,07±0,11	0,91±0,13	0,74±0,18
Linfócitos B	mRNA IGF-I (U.A.D.O.)	0,87±0,13	1,18±0,18	0,69±0,07	0,91±0,20
	mRNA IGF-IR (U.A.D.O.)	1,01±0,08	1,00±0,09	0,88±0,08	0,78±0,12

Tabela 4.Médias dos valores (média ± EPM) dos dados anatomopatológicos e laboratoriais dos pacientes portadores<br/>do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento

### 2. Análise do Eixo GH-IGF-IGFBP

As concentrações plasmáticas de glicose, hGH, IGF-I total e livre, IGFBP2 e IGFBP3 dos pacientes portadores do VHC nos períodos pré e pós-tratamento encontravam-se dentro dos limites da normalidade.

Embora os dados obtidos na análise das médias das concentrações plasmáticas do IGF-I total não tenham revelado diferença significativa entre os grupos com e sem RVS, nos períodos pré e póstratamento, foi possível evidenciar que as médias das concentrações de IGF-I total no grupo de pacientes que apresentaram RVS foram mais elevadas do que no grupo de pacientes não respondedores, tanto no período pré quanto no período pós-tratamento (Figura 17).

As médias das concentrações plasmáticas de IGF-I livre e IGFBP3 foram estatisticamente diferentes entre os grupos de pacientes com e sem RVS e nos períodos pré e pós-tratamento (p<0,05). A média das concentrações basais de IGF-I livre circulante no grupo de pacientes com RVS foi significativamente maior que a média das concentrações basais de IGF-I livre circulante do grupo de pacientes não respondedores (p<0,05). A média das concentrações plasmáticas de IGFBP3 no período pós-tratamento foi estatisticamente maior no grupo de pacientes com RVS em relação ao grupo de não respondedores (p<0,05) (Figura 18).



Figura 17. Representação gráfica das médias das concentrações plasmáticas de IGF-I total dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento.



**Figura 18.** Representação gráfica das médias das concentrações plasmáticas de IGF-I livre e de IGFBP3 dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e póstratamento.

Foi possível verificar aumento nas médias das concentrações plasmáticas de IGFBP2 no grupo pós-tratamento, com e sem RVS, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento (Figura 19).


Figura 19. Representação gráfica das médias das concentrações plasmáticas de IGFBP2 dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento.

## 3. Análise da Expressão dos Genes do IGF-I e do IGF-IR

A Figura 20 mostra as médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em tecido hepático dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e pós-tratamento. Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do conteúdo de mRNA do gene do IGF-I nos grupos de pacientes com e sem RVS, pré ou pós-tratamento.

Os dados obtidos na análise das médias do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR revelaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com e sem RVS e nos períodos pré (n=30) e pós-tratamento (n=12) (p<0,05). Nos pacientes que apresentaram RVS a magnitude de expressão de mRNA do gene do IGF-IR após o tratamento foi estatisticamente menor em relação ao basal (p<0,05). Tal fato não foi observado no grupo de pacientes não respondedores.

As médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos T são apresentados na Figura 21. O grupo de pacientes com RVS apresentou magnitude de expressão de mRNA do gene do IGF-I estatisticamente superior ao do grupo de pacientes não respondedores quando se consideram os períodos pré e pós-tratamento conjuntamente (p<0,05). Não se observou diferença significativa entre as médias do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR nos grupos com e sem RVS, pré ou



**Figura 20.** Representação gráfica das médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em tecido hepático dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e póstratamento.



**Figura 21.** Representação gráfica das médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos T dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e póstratamento.

pós-tratamento.

Apesar da análise estatística não revelar diferença estatisticamente significativa entre as médias do conteúdo de mRNA do gene do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos B dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS e nos períodos pré e pós-tratamento, foi possível notar que a magnitude de expressão de mRNA do gene do IGF-I aumentou após o período de tratamento, independentemente da resposta apresentada (Figura 22).



**Figura 22.** Representação gráfica das médias do conteúdo de mRNA dos genes do IGF-I e do IGF-IR em linfócitos B dos pacientes portadores do VHC, com e sem RVS, nos períodos pré e póstratamento.

## 4. Análise Imuno-histoquímica do IGF-IR

A análise IHQ para o IGF-IR foi realizada em amostras de tecido hepático de 35 pacientes desta casuística no período pré-tratamento e em amostras de 10 pacientes no período pós-tratamento. Como controle positivo utilizou-se tecido hepático proveniente de biópsia de um paciente portador de colangiocarcinoma. O padrão de positividade foi observado em membrana citoplasmática do epitélio ductal maligno, evidenciando intensa proliferação de ductos (Figuras 23A e 23B). O padrão de positividade observado em células ductais de tecido hepático normal (Figuras 23C e 23D) foi, também, encontrado no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite C crônica. No entanto, foi possível observar um aumento expressivo da imunorreatividade do IGF-IR devido à intensa marcação da membrana citoplasmática e citoplasma de ductos biliares proliferados e em citoplasma de hepatócitos distribuídos em todas as regiões do lóbulo hepático (Figuras 24A, 24B e 24C). Não se observou marcação na região nuclear.

A análise IHQ em tecido hepático de pacientes portadores de HVC revelou positividade nos hepatócitos em 86% (30/35) dos casos estudados. Em 80% (24/30) dos casos com tal positividade, os hepatócitos estavam distribuídos em todas as regiões do lóbulo, zonas I, II e III do ácino de Rappaport (Gayotto, Alves, Melo, 2000) (Figura 24D). Em 17% (5/30) dos



- Figura 23. A) Controle Positivo Colangiocarcinoma: Imuno-expressão para IGF-IR em ductos (~100x).
  - B) Controle Positivo Colangiocarcinoma: Imuno-expressão intensa na membrana citoplasmática do ducto (~200X).
  - C) Tecido Hepático Normal Imuno-expressão em ductos (~100x).
  - E) Tecido Hepático Normal Imuno-expressão em ductos (~200X).

casos a marcação foi mais intensa, grau 2, na região periportal, zona I. Em 14% (5/35) dos casos, não se verificou positividade em hepatócitos.

Dos pacientes com alterações estruturais zero, 1 e 2, 16,5% (4/24) não apresentaram positividade em hepatócitos; 67% (16/24) apresentaram marcação escassa, e 16,5% (4/24), marcação intensa. Daqueles com estadio 3 e 4, 9% (1/11) não apresentaram marcação; 55% (6/11) apresentaram marcação escassa, e 36% (4/11), marcação intensa. Em alguns casos, principalmente em presença de cirrose, evidenciou-se padrão granular de positividade em citoplasma dos hepatócitos distribuídos em todas as regiões do lóbulo (Figura 24E).

Todos os casos, com exceção do caso nº 24, apresentaram positividade em ductos biliares, sendo que em 91% (31/34) a marcação foi considerada intensa, grau 2 (Figura 24F).

Em 80% (28/35) dos casos analisados verificou-se positividade em células ductais periportais (canais de Hering), sendo que em 89% (25/28) a marcação foi escassa, grau 1, e em apenas 11% (3/28) a marcação foi intensa, grau 2.

Tanto em linfócitos portais quanto em células de Kupffer o padrão de positividade foi escasso, grau 1, sendo que somente 49% (17/35) dos casos apresentaram positividade em linfócitos portais e apenas 14% (5/35) apresentaram positividade em células de Kupffer.

Não se observou marcação em linfócitos lobulares, células endoteliais e células estreladas.



- Figura 24. A) Imuno-expressão intensa em células ductais e no citoplasma dos hepatócitos (~100x).
  - B) Imuno-expressão intensa em células ductais e no citoplasma dos hepatócitos (~100x).
  - C) Imuno-expressão intensa em células ductais e no citoplasma dos hepatócitos (~100x).
  - D) Imuno-expressão intensa no citoplasma dos hepatócitos distribuídos no lóbulo hepático (~100x).
  - E) Imuno-expressão intensa evidenciando padrão granular no citoplasma dos hepatócitos (~400x).
  - F) Infiltrado portal e imuno-expressão intensa nos ductos periportais proliferados (~100x).

Não foram evidenciadas modificações no padrão de positividade do IGF-IR nas amostras de tecido hepático analisadas no período pós-tratamento, quando comparadas às analisadas no período pré-tratamento.

A análise estatística não revelou associação entre os resultados das diferentes variáveis analisadas no estudo imunohistoquímico: ductos biliares interlobulares, linfócitos portais, linfócitos lobulares, células de Kupffer, hepatócitos, células endoteliais e células ductais periportais (canais de Hering), assim como, entre estas e os resultados da análise das variáveis da biópsia hepática: alterações estruturais, infiltrado portal, atividade periportal, atividade parenquimatosa, esteatose, siderose e agregados linfóides.

## 5. Análise Comparativa dos Diferentes Achados

Na tabela 5 estão resumidos os dados mais relevantes obtidos na análise das correlações entre os achados anatomopatológicos e os diferentes resultados laboratoriais nos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento.

A análise comparativa das concentrações plasmáticas de IGF-I total com as variáveis peso e altura dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento revelou uma correlação negativa (Figura 25). Tabela 5.Correlações entre os achados anatomopatológicos e os<br/>diferentes achados laboratoriais nos pacientes portadores do<br/>VHC no período pré-tratamento

		hGH	IGF-I total	IGF-I livre	IGFBP3	IGF-IR em fígado
Infiltrado periportal	ρ:			-0,398		
	p:			0,0441		
	n:			26		
Atividade parenquimatosa	ρ:			-0,497	-0,391	0,335
	p:			0,0101	0,0477	0,0346
	n:			26	26	40
Albumina	ρ:		0,485	0,528		
	p:		0,04	0,0242		
	n:		18	18		
ALT	ρ:	0,407				
	p:	0,0389				
	n:	26				
hGH	ρ:					0,529
	p:					0,0195
	n:					19



Figura 25. Correlação das concentrações plasmáticas de IGF-I total com as variáveis peso e altura dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento.

Observou-se uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de hGH com a magnitude de expressão de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático, e também, com as concentrações séricas da enzima ALT dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento (Figura 26).

A Figura 27 representa a análise de correlação entre as concentrações séricas de albumina e as concentrações plasmáticas de IGF-I total e livre dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento, demonstrando uma correlação positiva entre as variáveis em questão.

Analisando-se os diferentes graus de estadiamento da atividade parenquimatosa das biópsias hepáticas com as concentrações plasmáticas de IGF-I livre e de IGFBP3 dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento foi observado correlação negativa (Figura 28). O inverso foi evidenciado quando se analisou os graus de estadiamento da atividade parenquimatosa das biópsias hepáticas com a magnitude de expressão de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento (Figura 29).

A Figura 30 representa os resultados da análise de probabilidade ("odds ratio") das diferentes variáveis estudadas calculadas de acordo com o método descrito por Wacholder et al. (2004). As razões estatisticamente significativas, níveis de corte que propiciam RVS, foram: idade ≤33 anos, IGF-I livre >1,35 ng/mL e o conteúdo de mRNA de IGF-I em linfócitos T >0,51 e B >0,79 U.A.D.O.



**Figura 26.** Correlação das concentrações plasmáticas de hGH com os níveis de expressão de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático e com as U.A. (unidades arbitrárias) da enzima ALT dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento.



Figura 27. Correlação das concentrações séricas de albumina com as concentrações plasmáticas de IGF-I total e livre dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento.



Figura 28. Correlação dos diferentes graus de estadiamento da atividade parenquimatosa das biópsias hepáticas com as concentrações plasmáticas de IGF-I livre e de IGFBP3 dos pacientes portadores do VHC, no período pré-tratamento.



Figura 29. Correlação dos diferentes graus de estadiamento da atividade parenquimatosa das biópsias hepáticas com os níveis de expressão de mRNA do gene do IGF-IR e com as concentrações plasmáticas de IGF-I livre dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento.



Figura 30. Análise das razões de probabilidade ("odds ratio") das diferentes variáveis estudadas calculadas de acordo com o método descrito por Wacholder et al., 2004. Os valores em parênteses indicam os níveis de corte que propiciariam RVS. As razões estatisticamente significativas foram: idade ≤33 anos, IGF-I livre >1,35 ng/mL e conteúdo de mRNA de IGF-I em linfócitos T >0,51 e B >0,79 U.A.D.O.

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

A hepatite C crônica (HCC) é uma doença infecciosa e, por vezes, de evolução fatal. Nos últimos anos, transformou-se em uma enorme ameaça para a saúde pública e, hoje, é a principal causa de cirrose, carcinoma hepatocelular, hemorragias digestivas e insuficiência hepática. Apesar disso, as pessoas infectadas pelo VHC permanecem muitas vezes assintomáticas e sem diagnóstico (Poynard et al., 2003).

Embora o vírus da hepatite C seja causa de um processo inflamatório no fígado e distúrbios funcionais hepáticos, a patogênese da infecção crônica ainda não é bem conhecida. Sabendo-se que o VHC não é citopático, sugere-se que o dano hepático na infecção crônica, provavelmente, esteja relacionado a uma resposta imune intermediária, do tipo celular, que é ampla o suficiente para induzir a destruição das células hepáticas e fibrose, mas não o suficiente para erradicar o vírus de seu hospedeiro (Heydtmann et al., 2001; Soto-Ramirez, 2002).

Mais de 170 milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas pelo VHC, o qual é responsável por mais de 100.000 casos de câncer hepático por ano. De acordo com a Organização

Mundial da Saúde, em 2001 as doenças hepáticas crônicas foram responsáveis por 1,4 milhões de mortes. Pelo menos 20% destes casos são atribuídos a infecções pelo VHC, perfazendo mais de 280.000 mortes (Lauer e Walker, 2001; El-Serag, 2002; WHO, 2002).

A introdução de novos agentes e regimes para o tratamento da HCC, tais como os interferons peguilados e a terapia combinada com a ribavirina, tem resultado em um aumento substancial nas taxas de RVS.

A taxa de RVS no presente estudo foi de 43%, comparável à citada nos grandes estudos clínicos randomizados que associam a ribavirina ao INF- $\alpha$  padrão em pacientes sem tratamento prévio, que é de aproximadamente 40%. Sabe-se que os índices de RVS são menores em estudos clínicos não randomizados, no entanto, é possível que os resultados aqui obtidos reflitam o fato dos pacientes tratados apresentarem algumas características consideradas favoráveis à RVS, tais como: baixa carga viral, mediana da idade ≤40 anos, IMC ≤30 kg/m<sup>2</sup> e baixo grau de estadiamento da fibrose hepática (McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Bressler et al., 2003; Zeuzen, 2004).

Uma grande variedade de modelos e sistemas de escores e uma série de testes qualitativos são utilizados para avaliar a capacidade metabólica do fígado em pacientes com doenças crônicas. No entanto, não existe nenhum teste padrão adotado que possa predizer mortalidade e sobrevida destes pacientes com suficiente exatidão. Em geral, os testes disponíveis são limitados devido à baixa sensibilidade e incapacidade de identificar a reserva hepática funcional, além do alto custo e dos possíveis efeitos colaterais das drogas utilizadas para a realização dos mesmos (Bircher, 1986; Assy et al., 1997; Assy et al., 1998).

A análise do perfil hepático da presente casuística revelou, conforme esperado, médias das concentrações séricas das enzimas AST e ALT estatisticamente mais elevadas no período pré-tratamento, tanto para os pacientes com RVS quanto para aqueles que não apresentaram tal resposta. As concentrações séricas basais destas enzimas para o grupo de pacientes com RVS foram estatisticamente menores quando comparadas às do grupo de pacientes sem RVS. Baseados nestes resultados pode-se inferir que as concentrações basais menores de aminotransferases seriam um fator preditor para RVS, provavelmente pelo fato destes pacientes terem sido expostos à menor agressão hepática pelo vírus.

Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, observou-se diminuição similar das médias dos valores dos escores das quatro variáveis das biópsias hepáticas entre os períodos pré e pós-tratamento, tanto no grupo de pacientes com RVS quanto no grupo sem RVS. A média dos escores basais no grupo com RVS foi menor do que no grupo sem RVS. Estes resultados sugerem que pacientes que apresentam baixos níveis de gradação nas quatro variáveis das biópsias hepáticas, possivelmente, respondem melhor ao tratamento, a despeito da afirmação de Gento-Pena et al. (2001), de que os achados histológicos não são preditores de resposta ao tratamento com interferon. A diminuição das médias dos escores das variáveis das biópsias hepáticas observada no grupo de pacientes não respondedores corroboram dados da literatura de

que mesmo pacientes sem RVS se beneficiam com a terapia combinada do INF-α padrão ou peguilado associado a ribavirina, melhorando os achados histológicos e diminuindo assim o risco de progressão para fibrose e carcinoma hepatocelular. (Poynard et al., 2000; Poynard et al., 2002; Toccaceli et al., 2003; Camma et al., 2004; Myung et al., 2004).

Os títulos do VHC têm demonstrado estreita associação com a resposta ao tratamento antiviral. Pacientes que apresentam carga viral basal ≤2x10<sup>6</sup> cópias/mL ou 10<sup>6</sup> UI/mL, respondem melhor à terapia anti-viral comparados aqueles com alta carga viral (McHutchison et al., 1998; Arnand e Velez, 2004). No presente estudo, a carga viral basal dos pacientes que apresentaram RVS não foi estatisticamente diferente da carga viral basal dos pacientes não respondedores ao tratamento. A carga viral também não foi um fator preditivo para RVS. Estes achados possivelmente refletem os níveis baixos de carga viral da população estudada.

Levando-se em consideração que o fígado é a principal fonte da maioria das proteínas séricas e que a albumina, produzida somente por este órgão, é a proteína circulante mais abundante e que sua síntese é inversamente relacionada à função hepática, é comum que pacientes com doenças hepáticas crônicas ou cirróticos apresentem concentrações séricas reduzidas de albumina e de outras proteínas plasmáticas. Por desempenhar uma variedade de funções, a diminuição na concentração de albumina determina um impacto relevante no metabolismo, na distribuição dos fluídos teciduais, na nutrição e no transporte de substratos. A capacidade biossintética dos hepatócitos pode, portanto, ser avaliada pela concentração da albumina circulante (Doweiko e Nompleggi, 1991; Sherlock, 1993; Tessary, 2003). Não observamos, entretanto, alterações nas médias das concentrações séricas de albumina nos grupos de pacientes com e sem RVS e nos períodos pré e pós-tratamento. Todos os valores encontravam-se dentro dos limites da normalidade, reforçando mais uma vez que a população estudada é constituída por pacientes que apresentavam uma reserva metabólica hepática ainda preservada.

Há várias décadas, inúmeros pesquisadores têm relatado que pacientes com doença hepática crônica grave, especialmente cirrose, apresentam alterações no eixo GH-IGF-IGFBP, principalmente baixas concentrações de IGF-I e de IGFBP3 circulantes, os quais se correlacionam significativamente com o grau de disfunção hepática e de progressão para fibrose. Segundo estes pesquisadores, а determinação destas concentrações combinada a outros achados laboratoriais representam bons preditores de sobrevida e devem ser utilizados como marcadores precoces de disfunção hepática (Möller e Becker, 1992; Möller et al., 1996; Scharf et al., 1996; Assy et al., 1997; Carregaro et al., 1997; Holt et al., 1997; Assy et al., 1998; Lou et al., 2001; Ormarsdóttir et al., 2001; Donaghy et al., 2002; Vyzantiadis et al., 2003; Wu et al., 2004).

No entanto, os relatos dos estudos referentes à determinação das concentrações de IGF-I e de IGFBP3 em pacientes com hepatite crônica por vírus B e C mostraram-se inconclusivos. Okan et al. (2000) mostraram que as concentrações basais de IGF-I, ao contrário dos estudos citados anteriormente, foram superiores às do grupo controle, composto por indivíduos sadios, enquanto que as concentrações de IGFBP3 foram estatisticamente menores. Tanto as concentrações de IGF-I quanto as de IGFBP3 não se correlacionaram com a atividade inflamatória, grau de fibrose ou com os níveis de aminotransferases. Baseados nos resultados obtidos, os autores sugerem que as concentrações dos componentes do eixo GH-IGF-IGFBP em pacientes com hepatite crônica sejam diferentes das encontradas em pacientes cirróticos e devem ser melhor avaliadas.

Os componentes do eixo GH-IGF-IGFBP (hGH, IGF-I total e livre, IGFBP2 e IGFBP3) avaliados na presente investigação apresentaramse dentro dos limites da normalidade. Estes resultados diferem daqueles relatados na maioria dos estudos, anteriormente citados, referentes à doença hepática avançada e corroboram as considerações apresentadas por Okan et al. (2000). Estes autores sugerem que esta divergência de resultados poderia ser atribuída aos seguintes fatores: heterogeneidade das populações estudadas, etiologia da doença hepática e baixo número de pacientes avaliados na maioria dos estudos apresentados na literatura. Levando-se em consideração o perfil da presente casuística, pode-se verificar que se trata de uma população extremamente homogênea, característica esta que se contrapõem às relatadas na literatura. Estes resultados indicam que a síntese dos vários componentes do eixo GH-IGF-IGFBP apresentava-se preservada nos pacientes aqui estudados.

Análise comparativa das médias das concentrações plasmáticas de IGF-I total, IGF-I livre, IGFBP2 e IGFBP3 no grupo de pacientes com e sem RVS nos períodos pré e pós-tratamento evidenciou que a média das concentrações basais de IGF-I livre no grupo de pacientes com RVS foi estatisticamente maior que a do grupo de pacientes não respondedores. A média das concentrações plasmáticas de IGFBP3 no período pós-tratamento foi estatisticamente superior no grupo de pacientes com RVS em relação ao grupo de não respondedores. Embora a diferença observada não tenha sido estatisticamente significativa, a média das concentrações plasmáticas de IGF-I total dos pacientes com RVS foi maior tanto no período pré quanto no período pós-tratamento em relação ao grupo sem RVS. Considerando que o fígado é o principal órgão produtor de IGF-I e de IGFBP3, poder-se-ia supor que as concentrações plasmáticas mais elevadas de IGF-I livre e de IGFBP3 observadas no grupo de pacientes com estivessem refletindo reserva hepática, inerentemente, RVS mais preservada neste grupo de pacientes. Estes pacientes, portanto, teriam maior capacidade de responder ao tratamento instituído. Alternativamente, devido ao seu papel sobre o sistema imunológico, as concentrações plasmáticas de IGF-I livre estariam expressando a integridade e capacidade de resposta do sistema imunológico do indivíduo constitucionalmente melhor predisposto a responder ao tratamento. Estes resultados são extremamente relevantes e até o momento não existem relatos na literatura abordando este aspecto.

Embora o IGF-IR seja expresso por quase todos os tipos de tecidos e células durante a embriogênese, no fígado, órgão que tem os maiores níveis de expressão de IGF-I, o mRNA do IGF-IR é quase que indetectável, possivelmente devido à infra-regulação ("down-regulation") do

receptor pelo IGF-I localmente produzido. Enquanto nos hepatócitos humanos normais praticamente não há receptores para o IGF-I, a expressão dos mesmos tem sido detectada em células hepáticas não parenquimatosas, tais como: células de Kupffer (KCs), células endoteliais (ECs) e células estreladas hepáticas (HSCs), o que confere a estas células susceptibilidade aos efeitos mitogênicos, autócrinos e parácrinos, do IGF-I (Caro et al., 1988; Brenzel e Gressner, 1996; Scharf et al., 1998; Sveguati-Baroni et al., 1999; Werner, 1999).

A superexpressão do IGF-IR e uma proliferação dose dependente após estímulo pelo IGF-I e II têm sido demonstradas em linhagens celulares de hepatomas e no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Este aumento tem sido considerado como um processo crucial para transformação celular e crescimento de tumores (Scharf, Dombrowski, Ramadori, 2001).

Kim, Park, Lee (1996) sugerem que a ativação do gene do IGF-IR pela proteína X do vírus da hepatite B participe do desenvolvimento do CHC relacionado ao vírus. Estes achados são particularmente relevantes uma vez que o aumento da expressão do IGF-II, um ligante do IGF-IR, tem sido observado em hepatite crônica ativa, hepatite persistente e em CHC associados aos vírus das hepatites B e C (Su et al., 1994)

Na presente investigação, foi possível demonstrar um aumento do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático de pacientes portadores de diferentes estadios da hepatite C crônica. Os achados imunohistoquímicos que podem explicar este aumento são a proliferação de ductos, já que as células ductais sabidamente expressam o IGF-IR, observada em todos os casos, independentemente do estadio, e o aumento da expressão do IGF-IR nos hepatócitos observado em 86% dos casos estudados. Embora a imunorreatividade para o IGF-IR tenha sido escassa nas células de Kupffer e nos linfócitos portais, não se pode descartar que a expressão deste receptor nestas células também tenha contribuído para a elevação do conteúdo de mRNA de IGF-IR observada em todos os casos estudados.

A resposta proliferativa a diversos tipos de lesão hepática é caracterizada por um aumento nas estruturas ductais, processo denominado reação ductal (Popper, 1990; Desmet, Roskams, Eiken, 1995). Em 1998, Harada et al. descreveram a reação ductal, localizada na placa limitante, em casos de hepatite C. Posteriormente, Libbrecht et al. (2000) observaram uma correlação significativa entre a extensão da proliferação de ductos e a magnitude da inflamação. A correlação positiva entre o conteúdo de mRNA do IGF-IR e a extensão da lesão parenquimatosa observada no presente estudo poderia refletir a associação entre o aumento da proliferação de ductos e o grau de inflamação. Esta hipótese corrobora os achados prévios que mostraram aumento de células ovais hepáticas, células progenitoras capazes de originar células ductais, diretamente relacionado à gravidade de doenças hepáticas crônicas, incluindo a hepatite C (Sell, 1998; Lowes et al., 1999).

A superexpressão do IGF-IR em hepatócitos também pode contribuir para explicar a correlação observada entre o conteúdo de mRNA

do IGF-IR e a extensão da lesão parenquimatosa e, poderia constituir uma tentativa de estimular a regeneração dos hepatócitos em resposta ao dano hepático. O papel do IGF-IR na regeneração hepática tem sido demonstrado em modelos animais. Caro et al. (1988) mostraram um aumento na ligação do IGF-I a seu receptor em hepatócitos isolados de ratos adultos após hepatectomia. O aumento de expressão do IGF-IR bem como do IGF-I também foi observado em hepatócitos de ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e o aumento da imunorreatividade foi proporcional ao desenvolvimento da fibrose (Wang et al., 2003). Assim, além de estimular a replicação dos hepatócitos, acredita-se que o IGF-I participe, conjuntamente com outras citocinas e fatores de crescimento, na ativação das HSCs, que passam de um estado de quiescência para um fenótipo fibrogênico, semelhante ao dos miofibroblastos, porquanto o IGF-I desempenha papel mitogênico para este tipo de células (Svegliati-Baroni et al., 1999).

Devido ao papel relevante do sistema IGF em mediar, não somente, o crescimento normal e a reparação tecidual, mas também a carcinogênese, a expressão e função de todos os componentes do sistema devem ser rigorosamente controladas. Embora o aumento da expressão do IGF-IR possa participar da regeneração hepatocítica, sugere-se que a replicação do VHC possa mediar a expressão do IGF-II e que estas duas alterações, ocorrendo simultaneamente, poderiam atuar como possíveis fatores para a hepatocarcinogênese associada ao VHC (Tanaka et al., 1996). No entanto, são necessários maiores esclarecimentos que possam comprovar se o aumento da expressão do IGF-IR em hepatócitos, na hepatite C crônica, resulta da ativação direta do gene do IGF-IR pelo VHC ou se é conseqüência da agressão crônica ao parênquima hepático.

A análise do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático dos pacientes que apresentaram RVS após o tratamento mostrou diminuição estatisticamente significativa da média de expressão de mRNA do gene do IGF-IR em relação ao período pré-tratamento. No entanto, o conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR no grupo de pacientes não respondedores não se alterou. A diminuição observada no conteúdo de mRNA do IGF-IR no grupo com RVS pode ser reflexo da melhora da doença hepática, uma vez que é sabido que os níveis de expressão deste gene em tecido hepático normal são quase indetectáveis (Werner, 1999). Embora também se pudesse levantar a hipótese de que um efeito do INF-α sobre os componentes do eixo GH-IGF-IGFBP pudesse contribuir para este achado, é provável que o efeito do INF não seja tão importante, pois não se observou diferença na expressão do IGF-IR hepático nos pacientes não respondedores tratados com INF-α.

O estudo do conteúdo de mRNA do IGF-I em linfócitos T e B revelou níveis médios de expressão superiores no grupo de pacientes com RVS tanto no período pré quanto no período pós-tratamento quando comparado com o grupo de pacientes sem RVS. No entanto, esta diferença alcançou significância estatística apenas em linfócitos T. Baseando-se no importante papel que o IGF-I exerce na imunidade, poder-se-ia supor que níveis aumentados de IGF-I em linfócitos T proporcionam uma melhor resposta imunológica para estes pacientes que favoreceria a RVS.

Não se observou modulação do conteúdo de mRNA do IGF-IR em linfócitos T e B dos pacientes tratados com INF- $\alpha$ . Estes achados são diferentes daqueles reportados por Oliveira et al. (2001), que mostraram um aumento significativo do IGF-IR em linfócitos T e B de pacientes portadores de LMC tratados com INF- $\alpha$ . Esta diferença poderia ser explicada pela dose de INF- $\alpha$  preconizada para o tratamento da LMC ser de 5 MU/m<sup>2</sup>/dia, maior do que a utilizada no tratamento da hepatite C (3 MU/3x/sem).

Estudos mostram que as concentrações plasmáticas de IGF-I são geneticamente determinadas. Sabidamente, em adultos existe uma substancial contribuição genética responsável pela variação interindividual das concentrações circulantes de IGF-I, IGF-II e IGFBPs (Kao et al., 1994; Harrella et al., 1996; Verhaeghe et al., 1996; Westwood et al., 2001). No presente estudo, verificou-se que os pacientes com menor estatura e peso apresentavam concentrações de IGF-I total mais altas. Esses resultados corroboram os achados de Gómez et al. (2004), que demonstram que as concentrações dos componentes do eixo GH-IGF-I diminuem com a idade e obesidade, especialmente em mulheres, e que esta diminuição estaria relacionada ao IMC e gordura corporal. Outro achado relevante e que confirma resultados agui apresentados foi obtido em estudos com gêmeos monozigóticos, nos quais as concentrações plasmáticas de IGF-I tiveram correlação positiva, estatisticamente significativa, com a estatura. característica geneticamente determinada (Jull, 2003).

Na presente investigação verificou-se correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de hGH e o conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático, bem como com as concentrações séricas de ALT. Poder-se-ia supor que as concentrações plasmáticas de hGH se elevam em relação à lesão hepática, evidenciada pelos aumentos dos níveis de ALT e de mRNA do IGF-IR, em resposta à diminuição da síntese de IGF-I, tanto maior quanto maior o acometimento hepático.

Considerando a correlação positiva entre as concentrações séricas de albumina e as concentrações plasmáticas de IGF-I total e livre, decorrentes da síntese hepática, poder-se-ia deduzir que o grau de comprometimento hepático, mesmo com lesões de graus leve a moderada, seria expresso por estes componentes. Estudos anteriores mostraram também que tanto as concentrações séricas de albumina como as plasmáticas de IGF-I total e livre apresentam-se alteradas nas doenças crônicas do fígado e podem ter valor prognóstico para a evolução da doença (Möller et al., 1996; Scharf et al., 1996; Caregaro et al., 1997; Lou et al., 2001; Tessari, 2003; Vyzantiadis et al., 2003; Wu et al., 2004).

Na presente investigação, constatou-se também que quanto maior o grau de atividade parenquimatosa, menores foram as concentrações plasmáticas de IGF-I livre e de IGFBP3. Estes resultados evidenciam que as lesões hepáticas de grau leve a moderado, como observado nesta casuística, influenciam de maneira direta na produção de IGF-I e IGFBP3.

Outro aspecto interessante e de extrema relevância, que complementa os apresentados até o presente momento, é a análise de probabilidade. As variáveis preditivas de RVS, com razões estatisticamente significativas, foram: idade ≤33 anos, IGF-I livre >1,35 ng/mL, mRNA IGF-I

em linfócitos T >0,51 e B >0,79 U.A.D.O.

Embora não se tenha evidenciado algumas das variáveis clássicas de valor preditivo de RVS, devido, possivelmente, às características da população estudada, ressalta-se que, por ser um teste não invasivo, de fácil aplicação, razoavelmente fidedigno e de baixo custo, a determinação da concentração plasmática de IGF-I livre, ainda não mencionada na literatura, poderia ser considerada na rotina laboratorial quando da avaliação prévia de pacientes portadores de HCC a serem submetidos à terapia combinada com INF-α e ribavirina

VI. CONCLUSÕES
## **VI. CONCLUSÕES**

- A média das concentrações basais de IGF-I livre circulante no grupo de pacientes com RVS foi estatisticamente maior em relação à média das concentrações basais de IGF-I livre circulante do grupo de pacientes não respondedores;
- A média das concentrações plasmáticas de IGFBP3 circulante no período pós-tratamento foi significativamente maior no grupo de pacientes que alcançou RVS em relação aos não respondedores;
- 3. Existe um aumento do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR no tecido hepático de pacientes portadores de hepatite C crônica em relação ao tecido hepático normal, independentemente do grau de lesão, provavelmente as custas de proliferação de células ductais e do aumento de expressão de IGF-IR em hepatócitos;

- 4. Nos pacientes que apresentaram RVS, a média do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR após o tratamento foi estatisticamente menor em relação à do período pré-tratamento. A média do conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR no grupo de pacientes nãorespondedores não se alterou com o tratamento;
- As concentrações plasmáticas de IGF-I total circulante correlacionaram-se com as variáveis peso e altura dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento;
- 6. Existe uma correlação positiva entre as concentrações de hGH circulante e o conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático e, também, entre as concentrações de hGH circulante e as concentrações séricas da enzima ALT dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento;
- As concentrações séricas de albumina se correlacionaram positivamente com as concentrações plasmáticas de IGF-I total e livre circulantes dos pacientes portadores do VHC no período prétratamento;

- Existe uma correlação negativa entre o estadiamento da atividade parenquimatosa da biópsia hepática com as concentrações plasmáticas de IGF-I livre e com as concentrações de IGFBP3 dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento;
- O grau de atividade parenquimatosa da biópsia hepática se correlacionou positivamente com o conteúdo de mRNA do gene do IGF-IR em tecido hepático dos pacientes portadores do VHC no período pré-tratamento;
- De acordo com a análise de probabilidade (OR: "odds ratio"), as variáveis preditivas de RVS com razões estatisticamente significativas, foram: idade ≤33 anos; IGF-I livre >1,35 ng/mL (OR: 17,3; LC: 2,4 127,3) e mRNA IGF-I em linfócitos T >0,51 e B >0,79 U.A.D.O. (OR: 11,5; LC: 1,2 -111,5).

**VII. ANEXOS** 



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CAIXA POSTAL, 3671

SÃO PAULO - BRASIL

#### **DIRETORIA CLÍNICA**

# Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

# 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 13.12.00, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 587/00 intitulado: **"Efeito do Interferon**α **sobre as expressões de genes do sistema IGF em pacientes portadores de hepatite C "**, apresentado pelo(a) pesquisador(a) **José Tadeu Stefano**, da Área de Fisiopatologia Experimental.

CAPPesq, 13 de dezembro de 2000.

& Kel

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO Presidente da Comissão de Ética Para Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: 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").

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:			
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:		. SEXO: M	F
DATA NASCIMENTO:///			
ENDERECO:	N°	APTO:	
BAIRRO:	CIDADE:		
CEP: TELI	EFONE: DDD ( )		
2.RESPONSÁVEL LEGAL: NATUREZA (grau de parentesco, tutor, c DOCUMENTO DE IDENTIDADE : DATA NASCIMENTO.:// ENDEREÇO: CIDADE:	urador etc.) S Nº A  EFONE: DDD ( )	ехо: м арто:	 F 

#### **II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: EFEITO DO INTERFERON ALFA SOBRE AS EXPRESSÕES DE GENES DO SISTEMA IGF EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C.
- PESQUISADOR: JOSÉ TADEU STEFANO CARGO/FUNÇÃO: PÓS GRADUANDO INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 3151-1 UNIDADE DO HCFMUSP: FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL/ LABORATÓRIO DE ENDOCRINOLOGIA CELULAR E MOLECULAR – LIM/ 25.
- **3.** AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

# III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Você é portador do vírus da hepatite C e precisa receber tratamento com dois medicamentos: o interferon alfa e a ribavirina. Esta pesquisa servirá para sabermos se os medicamentos que você utilizará para seu tratamento aumentarão a quantidade de IGFs (Fatores de Crescimento Insulina Símile, seus receptores e proteínas ligantes), substâncias que são produzidas em diferentes locais do organismo, mas principalmente no fígado, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do seu organismo, podendo ser responsável pelo controle de suas células de defesa. Normalmente, nas doenças crônicas do fígado estas substâncias estão diminuídas.

 procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais.

Para seu tratamento são realizadas de rotina duas biópsias de fígado, uma antes do tratamento e outra no final. Normalmente, é coletado um pequeno "pedaço" do fígado com uma agulha especial. Se você concordar em participar desta pesquisa, nós vamos pegar um "pedacinho" (10%) para medirmos as substâncias (IGFs) que serão estudadas. No mesmo dia da biópsia e mensalmente será coletada uma pequena quantidade de sangue para exames. Normalmente, as duas biópsias e a coleta de sangue mensal já são feitas de rotina durante o tratamento em todos os doentes. 3. desconfortos e riscos esperados

Os desconfortos e os riscos esperados são independentes deste projeto de pesquisa. Os riscos são aqueles decorrentes do tratamento utilizado para portadores do vírus da hepatite tipo C, isto é, da retirada de sangue e da biópsia de fígado. Não são esperados desconfortos além dos que ocorrem normalmente no seu tratamento e que seu médico já explicou a você.

4. benefícios que poderão ser obtidos

Com os resultados obtidos poderemos avaliar melhor quais pacientes se beneficiarão com este tratamento e talvez termos um exame mais preciso para avaliar a resposta do seu organismo ao tratamento.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não será realizado qualquer outro exame a não ser aqueles que você se submeteria normalmente.

#### IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

 acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

O pesquisador e seu departamento se disponibiliza a qualquer momento para esclarecer dúvidas e prestar informações ao paciente.  liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

O paciente terá total liberdade de retirar-se do estudo a qualquer tempo, sem que isto traga prejuízo a pesquisa. Vale esclarecer que não iremos trabalhar diretamente com o paciente, apenas com um fragmento do fígado, obtido durante a biópsia indicada pelo médico.

**3.** salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

As informações de caráter médico serão mantidas em sigilo absoluto, sendo utilizados somente os resultados dos exames realizados pelo paciente.

**4.** disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Caso haja algum dano a sua saúde, o Serviço de Cirurgia Experimental e o Laboratório de Investigação Médica LIM/ 25, fornecerá total apoio e assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Não cabe indenização visto que os eventuais danos causados serão inerentes ao tratamento, sendo que o paciente terá total liberdade e esclarecimento para optar em fazê-lo.

#### V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

JOSÉ TADEU STEFANO, Av. Dr. Arnaldo, 455, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular, Tel. 30667467.

DANIEL GIANNELLA-NETO, Av. Dr. Arnaldo, 455, Lab. de Endocrinologia Celular e Molecular, Tel.30667467.

PAULO CELSO BOSCO MASSAROLLO, Av. Dr. Arnaldo, 455, Serviço de Cirurgia Experimental, Tel. 30623300.

### vi. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

#### VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 2001.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível)

# ANEXO C – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO DE PACIENTES COM HVC NO PERÍODO PRÉ -

CASO	№ da BIÓPSIA	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	INFILTRADO PORTAL	ATIVIDADE PERIPORTAL	ATIVIDADE PARENQUIMATOSA	ESTEATOSE	SIDEROSE	AGREGADOS LINFÓIDES
1	47.2550-6	2	2	2	2	3	1 CK	0
2	47.1872-0	2	2	2	2	1	1 CK	1
3	47.3336-3	2	2	2	2	1	0	0
4	47.3335-5	2	3	2	1	0	0	1
5	57.4652-3	1	2	2	1	3	0	1
6	47.4665-1	1	2	3	2	1	0	2
7	47.5004-7	3	3	3	2	1	1	1
8	47.5310-0	1	1	1	1	2	0	0
9	47.6255-0	1	3	2	1	1	0	1
10	47.5700-9	0	2	1	2	0	2 H	1
11	47-5955-9	1	2	2	1	1	0	2
12	47.6258-4	1	2	2	1	1	1 CK	2
13	47.6114-6	1	2	2	1	0	0	1
14	47.6257-6	0	1	0	1	1	0	0
15	47.6457-9	1	2	2	2	2	0	0
16	47.7170-2	1	1	0	1	0	0	0
17	47.7301-2	1	3	2	2	1	0	1
18	47.7580-5	1	2	2	2	0	0	1
19	47.7983-5	1	2	2	1	1	1 CK	0
20	47.8224-0	1	2	2	2	2	0	0
21	47.9000-6	1	4	3	3	0	1 CK	1
22	48.0118-0	1	2	2	2	1	0	1

## TRATAMENTO.

ONTINUA

CASO	№ da BIÓPSIA	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	INFILTRADO PORTAL	ATIVIDADE PERIPORTAL	ATIVIDADE PARENQUIMATOSA	ESTEATOSE	SIDEROSE	AGREGADOS LINFÓIDES
23	48.0388-4	1	2	2	1	0	0	2
24	48.1144-5	1	2	2	2	1	1 CK	1
25	48.1757-5	2	3	2	2	0	0	0
26	48.2565-9	1	4	2	2	2	0	2
27	48.2777-5	4	3	3	2	1	0	1
28	48.3400-3	4	3	4	3	0	0	2
29	48.3776-2	1	2	1	1	1	0	0
30	49.8973-2	1	3	1	2	1	0	1
31	48.8370-5	0	1	0	1	0	1 CK	0
32	49.0890-2	1	2	1	1	1	0	0
33	49.1286-1	4	4	3	3	1	0	2
34	49.1287-0	0	2	2	1	0	0	0
35	49.2017-1	1	1	1	1	1	1	0
36	49.2228-0	1	3	0	2	0	0	2
37	49.2597-1	1	3	3	2	1	0	2
38	49.3042-8	4	2	2	2	0	0	0
39	49.2598-0	0	1	0	1	0	0	0
40	49.3252-8	4	3	2	2	0	0	0
41	49.3692-2	1	2	1	1	0	1 CK	1
42	49.4363-5	1	1	1	1	0	0	0
43	49.4605-7	1	2	0	1	0	0	0
44	49.5252-9	2	1	1	1	1	0	0
45	49.5777-6	4	3	3	3	1	1 CK	0
46	49.6323-7	3	3	3	2	1	0	2
47	49.8202-9	1	3	2	2	0	0	0
8	49.9478-7	0	2	0	2	0	0	0

CONTINUA

CASO	№ da BIÓPSIA	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	INFILTRADO PORTAL	ATIVIDADE PERIPORTAL	ATIVIDADE PARENQUIMATOSA	ESTEATOSE	SIDEROSE	AGREGADOS LINFÓIDES
49	50.3325-0	1	1	2	2	1	0	2
50	50.3142-7	1	2	2	2	0	0	1
51	50.3586-4	3	3	2	1	3	0	1
52	50.4209-7	4	3	3	2	1	0	2
53	50.3702-6	1	1	1	0	1	0	0
54	50.3988-6	4	3	3	3	3	0	1
55	50.3987-8	1	1	0	1	0	2 CK-H	0
56	50.5036-7	3	3	3	2	1	0	1
57	50.5037-5	1	1	0	1	1	0	0
58	SN	1	2	3	2	2	0	2
59	50.6581-0	1	3	2	2	1	0	1
60	50.7231-0	1	1	0	1	0	0	0
61	50.7583-1	2	3	2	2	0	0	2
62	50.7584-0	2	2	2	2	3	3 CK	0
63	50.7582-3	3	3	3	3	2	1 CK	0
64	50.8265-0	4	3	4	4	0	0	0
65	50.9719-3	1	2	2	1	0	0	0
66	51.2961-3	3	3	3	2	2	0	1
67	51.6267-0	1	1	0	1	3	0	0
68	51-4177-0	1	1	2	1	1	0	1
69	51.8053-8	2	3	3	2	2	0	1
70	51.9164-5	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG
71	51.9583-7	1	1	0	1	0	0	0
72	52.0825-4	1	1	0	1	0	0	1
73	55.4665-5	1	2	2	2	1	0	0
74	52.5476-0	0	0	0	1	0	0	0

CONTINUA

CASO	№ BIÓPSIA	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	INFILTRADO PORTAL	ATIVIDADE PERIPORTAL	ATIVIDADE PARENQUIMATOSA	ESTEATOSE	SIDEROSE	AGREGADOS LINFÓIDES
75	52.6157-0	4	3	3	3	3	0	2
76	52.9399-5	3	4	4	3	0	0	0
77	53.2238-3	1	2	2	1	0	0	0
78	53.5477-3	1	1	1	1	1	0	0
79	53.5410-2	1	3	2	1	0	0	2
80	53.5476-5	1	2	2	1	0	0	0

LEGENDA:

SN = SEM NÚMERO DE REGISTRO		CK =	CÉLULAS DE KUPFFER
SG = SEM GRADAÇÃO	H =	HEPA	TÓCITOS

## ANEXO D – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO DE PACIENTES COM HVC NO PERÍODO PÓS -TRATAMENTO.

CASO	№ da BIÓPSIA	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	INFILTRADO PORTAL	ATIVIDADE PERIPORTAL	ATIVIDADE PARENQUIMATOSA	ESTEATOSE	SIDEROSE	AGREGADOS LINFÓIDES
4P	53.1565-4	1	1	0	1	0	0	0
6P	SN	2	2	2	1	1	0	1
20P	54.3018-6	1	1	0	1	1	0	0
21P	57-4403-2	1	2	2	1	0	1 CK	1
23P	53-1566-2	2	3	2	1	0	0	1
25P	52.9114-0	2	2	1	2	0	0	0
27P	56.9237-7	4	2	2	1	2	0	0
34P	56.2817-2	1	2	2	1	0	0	1
43P	58.1707-2	0	1	0	1	0	0	0
47P	57.0848-6	1	2	0	2	1	0	0
51P	56.1712-0	2	2	2	1	1	0	1
52P	SN	2	2	2	1	0	0	1
54P	SN	4	3	3	3	2	0	2
56P	SN	3	4	4	2	1	1	1
61P	57.1393-5	0	2	1	1	0	0	2
63P	54.4033-5	4	2	3	2	2	0	1

LEGENDA:

SN = SEM NÚMERO DE REGISTRO CK = CÉLULAS DE KUPFFER

ANEXO E -	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO IGF-IR EM TECIDO HEPÁTICO DE PACIENTES COM HVC NO
	PERÍODO PRÉ-TRATAMENTO.

CASO	№ da BIÓPSIA	DUCTOS BILIARES INTERLOBULARES	LINFÓCITOS PORTAIS	LINFÓCITOS LOBULARES	CÉLULAS DE KUPFFER	HEPATÓCITOS	CÉLULAS ENDOTELIAIS	CÉLULAS DUCTAIS PERIPORTAIS (CANAIS DE HERING)
1	47.2550-6	2	0	0	0	0	0	0
2	47.1872-0	2	0	0	0	1D	0	1
3	47.3336-3	2	0	0	0	1PP	0	0
4	47.3335-5	2	0	0	0	1D	0	0
6	47.4665-1	2	1	0	1	1PP	0	0
11	47-5955-9	2	1	0	0	1D	0	1
12	47.6258-4	2	1	0	0	1PP	0	1
15	47.6457-9	2	1	0	0	2D	0	1
17	47.7301-2	2	0	0	0	1D	0	1
20	47.8224-0	2	1	0	0	1PP	0	1
21	47.9000-6	2	1	0	0	0	0	1
23	48.0388-4	2	1	0	1	1D	0	1
24	48.1144-5	0	0	0	0	1D	0	0
25	48.1757-5	1	1	0	0	2D	0	1
26	48.2565-9	1	1	0	0	1D	0	1
27	48.2777-5	2	1	0	0	1D	0	1
28	48.3400-3	2	0	0	0	1PP	0	1
34	49.1287-0	2	0	0	1	0	0	1
36	49.2228-0	2	1	0	1	1D	0	1
37	49.2597-1	2	0	0	0	1D	0	1
38	49.3042-8	2	1	0	0	2D	0	2
40	49.3252-8	2	0	0	0	2D	0	1
42	49.4363-5	2	0	0	0	2D	0	1

#### Continuação

CASO	№ da BIÓPSIA	DUCTOS BILIARES INTERLOBULARES	LINFÓCITOS PORTAIS	LINFÓCITOS LOBULARES	CÉLULAS DE KUPFFER	HEPATÓCITOS	CÉLULAS ENDOTELIAIS	CÉLULAS DUCTAIS PERIPORTAIS (CANAIS DE HERING)
43	49.4605-7	2	0	0	1	1D	0	1
47	49.8202-9	2	0	0	0	0	0	0
48	49.9478-7	2	1	0	0	2D	0	1
49	50.3325-0	1	1	0	0	1D	0	1
51	50.3586-4	2	1	0	0	1D	0	1
52	50.4209-7	2	2	0	0	2D	0	1
54	50.3988-6	2	0	0	0	2D	0	2
56	50.5036-7	2	0	0	0	1D	0	1
59	50.6581-0	2	0	0	0	1D	0	0
63	50.7582-3	2	1	0	0	1D	0	1
66	51.2961-3	2	0	0	0	0	0	1
76	52.9399-5	2	0	0	0	1PP	0	2

#### LEGENDA:

GRADAÇÃO:

- 0 = AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO
- 1 = MARCAÇÃO ESCASSA
- 2 = MARCAÇÃO INTENSA
- PP = PERIPORTAL MARCAÇÃO DE HEPATÓCITOS DA ZONA I COM MAIOR INTENSIDADE EM RELAÇÃO AOS DO RESTANTE DO LÓBULO
- D = DIFUSA INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DO CITOPLASMA DOS HEPATÓCITOS É SEMELHANTE EM TODAS AS REGIÕES DO LÓBULO (ZONAS I, II e III).

# **ANEXO F** - ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO IGF-IR EM TECIDO HEPÁTICO DE PACIENTES NO PERÍODO PÓS-TRATAMENTO.

CASO	№ da BIÓPSIA	DUCTOS BILIARES INTERLOBULARES	LINFÓCITOS PORTAIS	LINFÓCITOS LOBULARES	CÉLULAS DE KUPFFER	HEPATÓCITOS	CÉLULAS ENDOTELIAIS	CÉLULAS DUCTAIS PERIPORTAIS (CANAIS DE HERING)
4	53.1565-4	2	0	0	0	1D	0	1
20	54.3018-6	2	1	0	0	1D	0	2
21	57-4403-2	2	0	0	0	2D	0	2
23	53-1566-2	2	0	0	0	1D	0	2
27	56.9237-7	2	0	0	0	2D	0	2
34	56.2817-2	2	1	0	0	1PP	1	2
43	58.1707-2	2	0	0	0	1D	0	1
47	57.0848-6	2	1	0	1	0	0	1
51	56.1712-0	2	1	0	0	0	0	2
61	57.1393-5	2	0	0	0	1D	0	2

#### LEGENDA:

GRADAÇÃO:

- 0 = AUSÊNCIA DE MARCAÇÃO
- 1 = MARCAÇÃO ESCASSA
- 2 = MARCAÇÃO INTENSA
- PP = PERIPORTAL MARCAÇÃO DE HEPATÓCITOS DA ZONA I COM MAIOR INTENSIDADE EM RELAÇÃO AOS DO RESTANTE DO LÓBULO
- D = DIFUSA INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DO CITOPLASMA DOS HEPATÓCITOS É SEMELHANTE EM TODAS AS REGIÕES DO LÓBULO (ZONAS I, II e III).

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams TE, Epa VC, Garret TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. Cell Mol Life Sci. 2000; 57(7): 1050-93.

Albert A, Benvegnù L. Management of hepatitis C. J Hepatol. 2003; 38:S104-S118.

Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: Implications for the future burden of chronic liver disease in United States. Hepatology. 2000; 31(3):777-82.

Arnand S, Velez M. Assessment of correlation between serum titers of hepatitis C and severity of liver disease. World J Gastroenterol. 2004; 10(16):2409-11.

Assy N, Hochberg Z, Amit T, Shen-Orr Z, Enat R, Baruch Y. Growth hormone-stimulated insulin-like growth factor (IGF) I and IGF- binding protein-3 in liver cirrhosis. J Hepatol. 1997; 27:796-802.

Assy N, Hochberg Z, Enat R, Baruch Y. Prognostic value of generation of growth hormone-stimulated insulin-like factor-I (IGF-I) and its binding protein-3 in patients with compensated and decompensate liver cirrhosis. Dig Dis Sci. 1998; 43(6):1317-21.

Auernhammer CJ, Fottner C, Engelhardt D, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Weber MM. Differential regulation of insulin- like growth factor-(IGF) I and IGF-binding protein (IGFBP) secretion by human peripheral blood cells. Horm Res. 2002; 57:15-21.

Baker DE. Pegylated interferon plus ribavirina for treatment of chronic hepatitis C. Rev Gastroenterol Disord. 2003; 3(2):93-109.

Bassit L, Santos GR, Silva LC, Takey T, Villaça P, Davi- Neto E, ChamoneD, Sáez-Alquézar A. Genotype distribution of hepatitis C in São Paulo, Brazil:Rare subtype fond [letter]. Hepatology. 1999; 29(3):994-5.

Bircher, J. Assessment of prognosis in advantage liver disease: To score or to measure, that is the question. Hepatology. 1986; 6(5):1036-7.

Blömsma MC, Knegt RJ, Dullaart RPF, Jansen LM. Insulin-like growth factor-I in liver cirrhosis. J Hepatol. 1997; 27:1133-8.

Brenzel A, Gressner AM. Characterization of insulin-like growth factor (IGF)-I-receptor sites during in vitro transformation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996; 34(5):401-9.

Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. Hepatology. 2003; 3:639-44.

van Buul-Offers SC, Kooijman R. The role of growth hormone and insulin like growth factors in immune system. Cell Mol Life Sci. 1998; 54:1083-94.

Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. Genet Mol Res. 2003; 2(1):117-23.

Camma C, Di Bona D, Schepis F, Heathcote EJ, Zeuzem S, Pockros PJ, Marcellin P, Balart L, Alberti A, Craxi A. Effect of peginterferon alfa-2a on liver histology in chronic hepatitis C: A meta-analysis of individual patients data. Hepatology. 2004; 39(2):333-42. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, Pereira LMMB, Coelho HSM, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CMC, Bernardini, AP. Geografic distribution of hepatitis C vírus genotypes in Brazil. Braz J Med Biol Res. 2005; 38(1):41-9.

Caro JF, Poulos J, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Sinha MK.Insulin-like growth factor I binding in hepatocytes from human liver,human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver. J Clin Invest. 1988; 81:976-81.

Caregaro L, Alberino F, Amodio P, Merkel C, Angeli P, Plebani M, Bolognesi M Gatta A. Nutritional and prognostic significance of insulin-like growth factor 1 in patients with liver cirrhosis. Nutrition. 1997; 13(3):185-90.

Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. Cancer Res. 1988; 48:6844-9.

Carithers RL, Emerson SS. Therapy of hepatitis C: Metaanalysis of interferon alpha 2b trials. Hepatology. 1997; 26(3 Suppl 1):83S-88S.

Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, Yap PL, Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. J Gen Virol. 1992; 73(5): 1131-41.

Chomczynski P. A reagent for single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and Proteins from cell and tissue samples. Biotechniques. 1993; 15(3):532-5.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. Science. 1989; 244:359-62.

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organization and diversity of the hepatitis c virus. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(6):2451-5.

Clark R. The somatogenic hormones and insulin like growth factor-1: Stimulators of lymphopoiesis and immune function. Endocr Rev. 1997; 18(2):157-79.

Clemente CM, Carrilho FJ. Epidemiologia. In: Silva LC, editor. *Hepatites Agudas e Crônicas.* São Paulo: Sarvier; 2003. p.109-34.

Craxi A, Licata A. Clinical trials results of peginterferons in combination with ribavirina. Semin Liver Dis. 2003; 23(1):35-46.

Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzen S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J. Interferon alpha 2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International therapy group. N England J Med. 1998; 339(21):1493-9.

Delidw BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase Chain Reaction: Basics Protocols. In: *Methods in Biology. PCR Protocols; Current methods and applications*. Totowa, New Jersey, EUA: Human Press; 1993. p.1-29.

Del Monte P, Bernasconi D, De Conca V, Randazzo M, Meozzi M, Badaracco B, Meseti S, Marugo M. Endocrine evaluation in patients treated with interferon-alpha for chronic hepatitis C. Horm Res. 1995; 44:105-9.

Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. Path Res Pract. 1995; 191:513-24.

Di Bisceglie AM. Hepatitis C. Lancet. 1998; 351:351-5.

Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. Hepatology. 2002; 36(5 Suppl 1):S121-S127.

Donaghy AJ, Delhanty PJD, Ho KK, Williams R, Baxter RC. Regulation of the growth hormone receptor/ binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis. J Hepatol. 2002; 36:751-8.

Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. J Parenter Enteral Nutr. 1991; 15(2):207-11. [Abstract em MEDLINE 1991].

Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, Rassam S, Fryden A, Reesink H, Bassendine M, Norkrans G, Cuypers T, Lelie N, Telfer P, Watson J, Weegink C, Sillikens P, Weiland O. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. J Hepatol. 1996; 25:591-8.

EASL International Consensus Conference on hepatitis C – Consensus Statement\*. J Hepatol. 1999; 30:956-61.

Edwards CK 3<sup>rd</sup>, Ghiasuddiin SM, Schepper JM, Yunger LM, Kelley KW. A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of super oxide anion. Science. 1988; 239(4841 pt1):769-71.

El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: An epidemiologic view. J Gastroenterol. 2002; 35 (Suppl 2):S72-S78. Fan ZR, Yang DH, Cui J, Qin HR, Huang CC. Expression of insulin like growth factor II and its receptor in hepatocellular carcinogenesis. World J Gastroenterol. 2001; 7(2):285-8.

Focaccia R, Conceição OJG, Sette Jr H, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lourenço R, Souza FV, Kiffer CR, Santos EB, Gonzalez MP, Saéz-Alquézar A, Riscal JR, Chamone D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of a municipality of São Paulo, measure by a serology survey of stratified, randomized residence-based population. Braz J Infect Dis. 1998; 2(6):269-84.

Fried MW, Shiffman M, Reddy R, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirina for chronic hepatitis C virus infection. N England J Med. 2002; 347(13):975-82.

Gayotto LCC e Comitê SBP/ SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas - Projeto do Clube de Patologia Hepática da Sociedade Bresileira de Patologia aprovado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia. Gastrenterologia Endoscopia Digestiva. 2000; 9(3):136-40. Geffner M. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on T- and B- lymphocytes and immune function. Acta Paediatr Suppl. 1997; 423:76-9.

Gento-Pena EG, Lopez-Morante A, Cordero-Guevara J, Echevarria-Iturbe C, Martin-Lorente, JL, Olcoz-Goni JL, Gonzalez-San-Martin F, Caro-Panton GA, Jorquera-Plaza F, Velicia-Llames R, Saez-Royuela F and Sociedad Castellano-Leonesa para El Estudio de las Enfermedades Hepáticas. An Med Interna. 2001; 18(7):351-6.

Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J. The IGF-I system component concentrations that decreased with ageing are lower in obesity in relationship to body mass index and body fat. Growth Horm & IGF Research. 2004; 14:91-6.

Gutfreund K, Bain VG. Chronic viral hepatitis C: Management update. Can Med Assoc J. 2000; 162(6):827-33.

Hadziyannis SJ, Cheinquer H, Morgan T, Diago M, Jensen DM, Sette Jr H, Romadori G, Bodenheimer HC, Marcellin P, Lee SD, Roberts PJ, Ackrill AM. Peginterferon alfa-2a (40 Kd)(PEGASYS) in combination with ribavirina (RBV): Efficiency and safety results from a phase III, randomized, doubleblind, multicentre study examining effect of duration of treatment and RBV dose [abstract]. J hepatol. 2002; 36(1):3. Harada K, Kono N, Tsuneyama K, Nakanuma Y. Cell-kinetic study of proliferating bile ductules in various hepatobiliary diseases. Liver 1998; 18: 277-84.

Harrella m, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Erriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P., Koistinen R, Seppälä M. Genetic and environmental components of interindividual variation in circulanting levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. J Clin Invest. 1996; 98:2612-5.

Harris TM, Rogler LE, Rogler CE. Reactivation of the maternally imprinted IGF2 allele in TGF alpha induced hepatocellular carcinomas in mice. Oncogene. 1998; 16:203-9.

Heemskerk VH, Daemen MARC, Buurman WA. Insulin-like factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev. 1999; 10:5-14.

Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and Chemokines in the immune response to hepatitis C infection. Curr Opin Infect Dis. 2001; 14(3):279-87. Holt RIG, Crossey PA, Jones JS, Baker AJ, Portmann B, Miell JP. Hepatic growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1, and insulin-like growth factor-binding protein messenger RNA expression in pediatric liver disease. Hepatology. 1997; 26(6):1600-6.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. Hepatology. 1997; 26(3 Suppl 1):15S-20S.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: Course and outcome of hepatitis C. Hepatology. 2002; 36(5 Suppl 1):21S-29S.

Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggonner JG, Park Y, Jones EA. Treatment of non A, non B hepatitis with recombinant human alpha interferon: A preliminary report. N England J Med. 1986; 315(25):1575-81.

Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. Endocr Rev. 1995; 16(1):3-34.

Jull A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in Health and disease. Growth Horm & IGF Research. 2003; 13:113-70. Kalvakolanu DV, Borden EC. An overview of the interferon system: Signal transduction and mechanisms of action. Cancer Invest. 1996; 14(1):25-53.

Kao PC, Matheny Jr AP, Lang CA. Insulin-like growth factor-I comparisons in healthy twin children. J Clin Endocrinol Metab. 1994; 78:310-2.

Karnam US, Reddy KR. Pegylated interferons. Clin Liver Dis. 2003; 7(1):139-48.

Keeffe EB. Peginterferons in hepatitis C virus: Virological, Pharmacokinetic, and clinical implications [Letter]. Semin Liver Dis. 2003; 23(Suppl 1):1-2.

Kim SO, ParkJG, Lee YI. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product. Cancer Res. 1996; 56:3831-6.

Kiess W. Molecular biology of the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor. In: ROSEFELD, RG & ROBERTS, CT, editors. *The IGF System Biology, Physiology, and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey, EUA: Human Press; 1999. p.89-109. Kooijman R, Willems M, Dehaas JC, Rijkers GT, Schuurmans ALG, van Bull-Offers SC, Heijen CJ, Zegers BJM. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on peripheral blood mononuclear cells. Endocrinology. 1992; 31(5):2244-50.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LD, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human Non-A, Non-B hepatitis. Science. 1989; 244:362-4.

Lasser D. Conventional techniques for mRNA. In: Köhler, TH, Labner D, Rost AK, Thamm B, Pustowoit B, Remke H, editors. *Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: Nonradiactive PCR Methods*. Berlin: Springer; 1995. p.54-63.

Lauer GM, Walker BD. Medical progress: Hepatitis C virus infection. N Engl J Med. 2001; 345(1):41-52.

Le Roith D, Adamo M, Werner H, Roberts Jr CT. Insulin-like growth factors and their receptors as growth regulators in normal physiology and pathological states. Trends Endocrinol Metab. 1991; 2(4):134-9.

Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. Endocr Rev. 2001; 22(1):53-74.

Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor I receptor. Endocr Rev. 1995; 16(2):143-63.

Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, Santos EB, Mitre HP, Mendonça JS, Cavalheiro NP, Barone AA, Wendel S. Three cases of infection with hepatitis c virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. J Clin Microbial. 2002; 40(7):2645-7.

Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic progenitor cells correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can progenitor cells migrate? J Pathol 2000; 192:373-8.

Lou M, Song N, Jin X, Luo SQ, Wang JJ. [Detection of serum free insulin-like growth factor 1 in patients with chronic viral hepatitis]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Zazhi. 2001; 15(3):291-2. [Abstract em MEDLINE 2001]. Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. Am J Pathol 1999; 154:537-41.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reidollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling MH, Albrecht JK. Therapy Group. Peginterferon alfa-2b plus ribavirina compared with interferon alfa-2b plus ribavirina for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. Lancet. 2001; 358:958-65.

Marek B, Kajdaniuk D, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Banas I, Sieminska L, Rzytki P, Kulakowska E, Lamch, Z. [Function of the growth hormone axis-insulin-like growth factors-insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver diseases]. Pol Merkuriusz lek. 2001; 10(57):185. [Abstract em MEDLINE 2001].

Mazziotti G, Sorvillo F, Morisco F, Carbone A, Rotondi M, Stornaiuolo G, Precone DF, Cioffi M, Gaeta GB, Caporaso N, Carella C. Serum insulin-like growth factor I evaluation as a useful tool for predicting the risk of developing hepatocelular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related. A prospective study. Cancer. 2002; 95(12):2539-45. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alpha 2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis C Therapy Group. N Englad J Med. 1998; 339(21):1485-92.

Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. J Viral Hepat. 2002; 9:84-100.

Möller S, Becker U. Insulin-like growth factor 1 and growth hormone in chronic liver disease. Dig Dis. 1992;10:239-48.

Möller S, Becker U, Juul A, Skakkebzek NE, Christensen E and The EMALD Group. Prognostic value of insulin-like growth factor I and its binding protein in patients with alcohol-induced liver disease. Hepatology. 1996; 23(5):1073-8.

Myung JM, Bouneva I, Salvatori J, Contos MJ, Shiffman ML, Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, Ferreira-Gonzalez A, Mills AS, Sanyal AJ. Fibrosisis progression is dependent upon hepatic inflammation in patients with chronic HCV. In: DDW 2004 – *Digestive Disease Week*. "Abstract and Personal Meeting Planner"; 2004 May 15-20; New Orleans, LA, *Abstracts*. New Orleans: DDW; 2004. [CD-ROM], NR M2018. Nielsen FC. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. Prog Growth Factor Res. 1992; 4(3):257-90. [Abstract em MEDLINE 1992].

NIH - National Institutes of Health: Management of Hepatitis C: Consensus and State of the Science Statements. 2002; 19(3):1-46.

Nissley SP. Type 2 IGF receptor-mediated events. In: ROSEFELD, RG & ROBERTS, CT, editors. *The IGF System Biology, Physiology, and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey, EUA: Human Press; 1999. p.165-97.

Nissley P, Lopaczynski W. Insulin-like growth factors receptors. Growth Factors. 1991; 5(1):29-43.

Norstedt G, Levinovitz A, Moller C, Eriksson LC, Andersson G. Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II mRNA during hepatic development, proliferation and carcinogenesis in the rat. Carcinogenesis. 1988; 9:209-13.

Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJC. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. Breast Cancer Res Treat. 1998; 47(3):269-81.
Okan A, Comlekci A, Akpinar H, Okan I, Yesil S, Tankurt E, Simsek I. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in patients with chronic hepatitis. Scand J Gastroenterol. 2000; 35(11):1212-5. [Abstract em MEDLINE 2000].

Ormarsdóttir S, Ljunggren O, Mallmin H, Olofsson H, Blum WF, Lööf L. Circulating levels of insulin-like growth factors and their binding proteins in patients with chronic liver disease: lack of correlation with bone mineral density. Liver. 2001; 21:123-8.

Oliveira MR, Ohnuma L, Bendit I, Dorlhiac-Lace P, Giannella-Neto D. Interferon-alpha therapy increases type I insulin-like factor receptors expression on lymphoid cells from patients with chronic myelogenous leukemia. Leuk Res. 2001; 25:711-7.

PEGASYS<sup>®</sup> (Peginterferon alfa 2a). Complete product information. [Internet]. 2002 Dec [cited 2003 Dec 15]; [about 25p.]. Available from: URL: <u>http://www.rocheusa.com/products/pegasys/pl.pdf</u>

PEGINTRON<sup>®</sup> (Peginterferona alfa 2b). O único que possibilita a individualização de doses no tratamento da hepatite C. Monografia. [Internet]. [cited 2003 Dec 15]. Available from: URL: <u>http://www.pegintron.com.br/monografia.asp</u>

Pianko S, McHutchison J. Retreatment of hepatitis C patients does no respond to interferon: The search continues [editorial]. Am J Gastroenterol. 2000; 95(5):1122-4.

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. Nature Rev 2004; 4:505-18.

Popper H. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial systems. Prog Liver Dis 1990; 9:27-38.

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomized trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group. Lancet. 1998; 352(9138):1426-32.

Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. for the PEG-FIBROSIS Project Group. Gastroenterology. 2002; 122(5):1303-13.

Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Detection and Significance. Semin Liver Dis. 2000; 20(1):47-55. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. Lancet. 2003; 362:2095-100.

Price JA, Kovach SJ, Johnson T, Koniaris LG, Cahill PA, Sitzmann JV, McKillop IH. Insulin-Like Growth Factor I Is a Comitogen for Hepatocyte Growth Factor in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. Hepatology. 2002; 36:1089-97.

Rapaport RG, Bozzola M. Growth hormone, insulin-like growth factor and the immune system [letter]. Acta Paediatr Suppl. 1997; 423:69.

Reddy KR. Symposium on treatment of chronic hepatitis C: Optizing patient management with new approaches. In: Selected highlights from digestive disease week [Internet]. 2001 May 20-23 [cited 2003 Dec 15]. Available from: URL:

## http://www.hivandhepatitis.com/2001conf/ddw2001/main.html

Reichard O, Norkrans G, Fryden A, Braconier JH, Sonnerborg A, Weiland O. Randomized double-blind, placebo- controlled trial of interferon alpha 2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. Lancet. 1998; 351(9096):83-7. Renier G, Clément I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-α production. Endocrinology. 1996; 137(11):4611-18. Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis c virus infection. Hepatology. 2002; 36(5 Suppl 1):S106-S113.

Rotwein, P. Molecular biology of IGF I and IGF II. In: Rosenfeld, R. & Roberts, C.T, editors. *The IGF System. Molecular, Physiology and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey, EUA: Human Press; 1999. p.19-36.

Scharf JG, Braulke T. The role of IGF axis in hepatocarcinogenesis. Horm Metab Res. 2003; 35:685-93.

Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. J Clin Pathol: Mol Pathol. 2001; 54:138-44.

Scharf JG, Knittel T, Dombrowski F, Müller L, Saile B, Braulke T, Hartmann H, Ramadori G. Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. Hepatology. 1998; 27:1275-84. Scharf JG, Schmitz F, Frystyk J, Skjaerbaek C, Moesus H, Blum WF, Ramadori G, Hartmann H. Insulin-like growth factor-I serum concentrations and patterns of insulin-like growth factor binding proteins in patients with chronic liver disease. J Hepatol. 1996; 25:689-99.

Sedlaczek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. Br J Cancer 2003; 88:733-9.

Seeff LB. Natural history of hepatitis C. Hepatology. 1997; 26(3 Suppl 1): 21S-28S.

Seeff LB. Natural history of hepatitis C. Hepatology. 2002; 36(5 Suppl1): 35S-46S.

Sell S. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. Hepatology 1998; 27:317-31.

Sherlock S. Assessment of liver function. In: Sherlock S, Dooley J, editors. *Diseases of Liver and Biliary System*. London: Blackwell Scientific; 1993. p.17. Simmonds P, Albert A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, Choo QL, Colombo M, Cuypers HTM, Date T, Dusheiko GM, Esteban JI, Fay O, Hadziyannis SJ, Han J, Hatzakis A, Holmes EC, Hotta H, Houghton M, Irvine B, Kohara M, Kolberg JA, Kuo G, Lau JYN, Lelie PN, Maertens G, McOmish F, Miyamura T, Mizokami M, Nomoto A, Prince AM, Reesink HW, Rice C, Roggendorf M, Schalm SW, Shikata T, Shimotohno K, Stuyver L, Trépo C, Weiner A, Yap PY, Urdea MS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes [letter]. Hepatology. 1994; 19(5):1321-4.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus in six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. J Gen Virol. 1993; 74:2391-9.

Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, Le Roith D, Tornell J, Isaksson JO, Ohlsson C. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:7088-92. Sohda T, Yun K, Iwata K, Soejima H, Okumura M. Increased expression of insulin-like growth factor 2 in hepatocellular carcinoma is primarily regulated at the transcriptional level. Lab Invest. 1996; 75:307-11. Soto-Ramirez LE. [Physiopathology of hepatitis C virus infection]. Rev Gastroenterol Mex. 2002; 67(Suppl 2):S21-4. [Abstract em MEDLINE 2002].

Stark GR, Kerr IM, Williams RG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998; 67:227-64.

Steele-Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rutter WJ, Roth RA. Expression and characterization of functional human insulin-like growth factor I receptor. J Biol Chem. 1988; 263(23):11486-92.

Su Q, Liu YF, Zhang JF, Zhang SX, Li DF, Yang JJ. Expression of insulin-like growth factor II in hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: its relationship with hepatitis B virus antigen expression. Hepatology 1994; 20: 788-99.

Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F. Insulin and Insulinlike growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: Differential effects on signal transduction pathways. Hepatology. 1999; 29(6):1743-51. Tanaka S, Takenaka K, Matsumata T, Mori R, Sugimachi K. Hepatitis C virus replication is associated with expression of transforming growth factor-alpha and insulin-like growth factor-II in cirrhotic livers. Dig Dis Sci 1996, 41:208-15.

Tessary P. Protein metabolism in liver cirrhosis: from albumin to muscle myofibrils. Curr Opin Nutr Metab Care. 2003; 6:79-85.

Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. Hepatology. 2002; 36(5 Suppl 1):S99-S105.

Toccaceli F, Laghi V, Capurso L, Koch M, Sereno S, Scuderi M. and The Italian Hepanet Group. Long-term liver histology improvement in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon. J Viral Hepat. 2003; 10:126-33.

Verhaeghe J, Loos R, Vlietinck R, Herck EV, van Bree R, Schutter AM. C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in cord serum of twins: genetic versus environmental Am J Obstet Gynecol. 1996;175:1180-8. Vyzantiadis T, Theodoridou S, Giouleme O, Harsoulis P, Evgenidis N, Vyzantiadis A. Serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in patients with liver cirrhosis. Hepatogastroenterology. 2003; 50(51):814-6. [Abstract em MEDLINE 2003].

Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: An approach for molecular epidemiology studies. J Natl Cancer Inst. 2004; 96(6):434-42.

Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like factor receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. World J Gastroenterol. 2003; 9(6):1287-91.

Ward CW, Garret TPJ, McKern NM, Lou M, Cosgrove LJ, Sparrow LG, Frenkel MJ, Hoyne PA, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Lawrence LJ, Tulloch PA. The three dimensional structure of the type I insulin-like growth factor receptor. Mol Pathol. 2001; 54:125-32.

Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: Geographic differences and temporal trends. Semin Liver Dis. 2000; 20(1):1-16.

Watzinger F, Lion T. Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays. Leukemia. 1998; 12(12):1984-93.

Werner H. Molecular Biology of the type I IGF receptor. In: ROSEFELD, RG & ROBERTS, CT, editors. *The IGF System Biology, Physiology, and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey, EUA: Human Press; 1999. p.63-88.

Werner H, Roberts CT. The IGFI receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors. Genes Chromosomes Cancer. 2003; 36(2):113-20.

Westwood M, Gibson JM, Sooranna SR, Ward S, Neilson JP, Bajoria R. Genes or placenta as modulator of fetal growth: evidence from the insulin-like growth factor axis in twins with discordant growth. Mol Hum Reprod. 2001; 7:387-95.

WHO - World Health Organization: Global surveillance and control of hepatitis C. J Viral Hepat. 1999; 6:34-47.

WHO - World Health Organization: Hepatitis C - Global prevalence (update). Weekly Epidemiol Rec. 2000; 75:17-28. WHO - World Health Organization: Global distribution of hepatitis A, B and C. Weekly Epidemiol Rec. 2002; 77(6):41-8.

Wu JC, Daughaday WH, Lee SD, Hsiao TS, Chou CK, Lin HD, Tsai YT, Chiang BN. Radioimmunoassay of serum IGF-I and IGF-II in patients with chronic liver diseases and hepatocelular carcinoma with or without Hypoglycemia. J Lab Clin Med. 1988; 112(5):589-94.

Wu YL, Ye J, Zhang S, Zhong J, Xi RP. Clinical significance of serum IGF-I, IGF-II and IGFBP-3 in liver cirrhosis. World J Gastroenterol. 2004; 10(18):2740-3.

Yau L, Lukes H, McDiarmid H, Werner J, Zahradka P. Insulin-like growth factor-I (IGF-I)-dependent activation of pp42/44 mitogen-activated protein kinase occurs independently of IGF-I receptor kinase activation and IRS-1 tyrosine phosphorylation. Eur J Biochem. 1999; 266:1147-57.

Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. J Clin Gastroenterol. 2003, 36(1):47-53.

Xu X, Mardell C, Xian CJ, Zola H, Read LC. Expression of functional insulin-like growth factor-1 receptor on lymphoid cell subsets of rats. Immunology. 1995; 85(3):394-9.

Zeuzen S. Hepatitis C virus: Kinetics and quasispecies evolution during anti viral therapy. Forum. 2000; 10(1):32-42.

Zeuzen S. Heterogeneous virológica response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: Who responds less well? Ann Intern Med. 2004; 140(5):370-81.

Zindy F, Lamas E, Schmidt S, Kirn A, Brechot C. Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-II, IGF-I and insulin receptors mRNAs in isolated non-parenchymal rat liver cells. J Hepatol. 1992; 14:30-4.