

# Expressão da proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP/Trombospondina 5) em pacientes portadores de hepatite C crônica

## *Cartilage oligomeric matrix expression in patients with chronic hepatitis C*

JAQUELINE COSTA COELHO\*  
MIRIAN COHEN\*\*  
ANA LÍGIA BENDER\*\*\*  
CARLOS KUPSKI\*\*\*\*

### RESUMO

**Objetivos:** A Hepatite C crônica é uma doença insidiosa e progressiva que necessita de avaliação histológica hepática. Vários marcadores séricos têm sido estudados. A Cartilagem Oligomérica da Matrix Extracelular (COMP) é o quinto elemento da família das trombospondinas, proteínas extracelulares ligadoras de cálcio, sendo inicialmente isolada no tecido cartilaginoso. Um único estudo investigou a expressão da COMP em tecido hepático normal, portador de cirrose e hepatocarcinoma. Nosso estudo visa avaliar os níveis séricos de COMP em pacientes portadores de hepatite C crônica.

**Métodos e resultados:** Níveis séricos de COMP foram dosados em 10 pacientes com Hepatite C crônica (casos) e 100 pacientes saudáveis (controles). A diferença entre a COMP dos dois grupos não foi significativamente estatística e nem relacionada ao estágio clínico de fibrose hepática, genótipo viral, níveis plaquetários ou alterações de transaminases.

### ABSTRACT

**Purpose:** Chronic hepatitis C is an insidiously progressive disease, in which repeated assessment of liver histology is required. Various serum markers have now been introduced. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is the fifth member of the trombospondin family of extra cellular calcium-binding proteins. It was initially isolated and characterized in cartilage tissue. One study investigated the expression of COMP in normal liver, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma tissues. Our present aim was to assess the serum COMP in patients with chronic hepatitis C.

**Methods and results:** Serum levels of COMP were measured in 10 patients with chronic hepatitis C (cases) and 100 healthy patients (controls). The difference between two groups was not statistical significant and not related to clinical stage of liver fibrosis, virus genotypes, platelets or transaminases alterations.

**Conclusion:** COMP was absent or rarely expressed in liver cirrhosis tissues. Others serum fibrotic markers have now been studied.

\* Residente do Serviço de Medicina Interna do Hospital São Lucas da PUCRS.

\*\* Acadêmica da FAMED-PUCRS.

\*\*\* Professora e Coordenadora da Faculdade de Farmácia da PUCRS.

\*\*\*\* Professor Adjunto da FAMED-PUCRS. Chefe do Serviço de Gastroenterologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

**Conclusão:** A COMP não encontra-se alterada em pacientes com hepatopatia crônica pelo HCV. Outros marcadores séricos necessitam ser avaliados.

**DESCRIPTORIOS:** MARCADORES BIOLÓGICOS; TROMBOSPONDINAS; HEPATITE C CRÔNICA; COMP, HEPATITE C CRÔNICA; CIRROSE HEPÁTICA.

**KEY WORDS:** BIOLOGICAL MARKERS; THROMBOSPONDINS; HEPATITIS C, CHRONIC; LIVER CIRRHOSIS.

## INTRODUÇÃO

A hepatite viral C é uma doença progressiva que raramente regride e pode resultar em cirrose hepática com alto risco para carcinoma hepatocelular (CHC). Embora a abordagem histológica seja necessária para o manejo clínico, a biópsia hepática está potencialmente associada a sérias complicações, além de não poder ser repetida frequentemente por razões éticas. Geralmente, a dosagem sérica de alanina aminotransferase (ALT) está pobremente correlacionada com a histologia hepática, tendo, portanto, um pequeno valor para o diagnóstico histológico. Um marcador não invasivo para a verificação da extensão da fibrose hepática na hepatite viral C seria de grande benefício para o conhecimento do estado clínico e prognóstico dos pacientes<sup>(1)</sup>.

Recentemente, vários marcadores para diagnóstico de fibrose hepática têm sido estudados, entre eles o peptídeo N-terminal do pró colágeno tipo III (PIIINP), a metaloproteinase (MMP)-1, gelatinase A (MMP-2) e o tecido inibidor das metaloproteinases (TIMP)-1<sup>(1)</sup>.

As trombospondinas (TSPs) compreendem uma família de glicoproteínas extracelulares ligadoras de cálcio. O protótipo do grupo é a Trombospondina-1 (TSP-1), que tem funções na agregação plaquetária, resposta inflamatória e regulação da angiogênese durante a cicatrização tecidual e crescimento tumoral. Muitas dessas propriedades são compartilhadas com a TSP-2. Outra TSP que tem sido estudada é Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem (COMP ou TSP-5), principalmente expressa nas cartilagens e outros tecidos conectivos. Pouco se sabe sobre a biologia da TSP 3 e TSP 4<sup>(2)</sup>.

As TSPs podem ser divididas em dois subgrupos de acordo com sua organização molecular: membros do subgrupo A (TSPs 1 e 2) são trímeros e contêm uma região de seqüência similar ao pró-colágeno, enquanto os do subgrupo

B (TSPs 3, 4 e 5) são pentâmeros e carecem desta região<sup>(2,3)</sup>.

Os níveis de TSPs nos fluidos corporais e sua distribuição no tecido mudam nos vários estados patológicos. Estão ligadas ao crescimento de tumores primários e a metástases, ao desenvolvimento da placa aterosclerótica, à malária e outras doenças<sup>(4)</sup>.

Cada TSP tem um padrão de expressão no desenvolvimento tecidual durante a vida. Dependendo do tipo celular e da TSP são vistas atividades adicionais, tais como: indução da organização do citoesqueleto, migração celular, modulação da proliferação celular e efeitos indiretos na função celular através da regulação de proteases extracelulares, ativação ou inibição de citocinas e fatores de crescimento<sup>(2)</sup>.

A COMP/TSP-5 é uma proteína não colágena existente na matriz cartilaginosa das articulações<sup>(5)</sup>, mas também pode ser detectada em tendões, meniscos, membranas sinoviais, humor vítreo e células musculares lisas vasculares, porém em quantidades significativamente menores<sup>(5,6,7,8)</sup>. COMP/TSP-5 e seus fragmentos no soro e sinóvia têm sido correlacionados com a osteoartrite, injúria articular e degradação cartilaginosa<sup>(2)</sup>. Mutações em seu gene causam pseudocondroplastia e displasia epifiseal múltipla, que são condrodisplasias autossômicas dominantes caracterizadas por baixa estatura, osteoartrite de início precoce e frouxidão ligamentar<sup>(3)</sup>. A presença dessa TSP e seu significado biológico fora dessas estruturas já citadas não têm sido reportados<sup>(9)</sup>.

Em um único trabalho encontrado na revisão de literatura, realizado por Xiao e colaboradores, através das análises com *northern blot* e *western blot*, a COMP se mostrou ausente ou raramente presente em tecido hepático normal ou com cirrose e significativamente expressa em carcinoma hepatocelular<sup>(9)</sup>. Considerando que os fatores de risco maiores para o desenvolvimento do CHC são as hepatopatias crônicas, como a hepatite e

cirrose, e visto que mais de 80% dos CHC se desenvolvem da cirrose, a qual é caracterizada por cicatrizes fibrosas e regeneração do parênquima, esse presente trabalho tem como hipótese conceitual verificar se os níveis séricos de COMP/TSP-5 são mais elevados em pacientes com cirrose por hepatite viral C em diferentes estágios, além de associar esses mesmos níveis com contagem plaquetária, aminotransferases, grau de fibrose e genótipo viral do paciente estudado.

## PACIENTES E MÉTODOS

Foram selecionados para esse estudo dez (10) pacientes, do Serviço de Gastroenterologia do HSL-PUCRS, com diagnóstico de hepatite por vírus C, associados ao álcool ou não, confirmados por PCR do HCV-RNA, com alteração de transaminases, que foram submetidos à biópsia num período não superior há 12 meses e ainda não tinham recebido terapia antiviral. Os pacientes foram classificados conforme o grau de fibrose de acordo com a classificação de Desmet: F0, ausência de fibrose; F1, fibrose leve (fibrose em região portal); F2, fibrose moderada (septos periportais ou portal-portal, mas com arquitetura preservada); F3, fibrose severa (fibrose com distorção da arquitetura, mas sem cirrose); F4, cirrose. Nenhum dos pacientes tinha evidências de CHC. As amostras sanguíneas usadas foram capturadas no Laboratório de Patologia Clínica do HSL-PUCRS durante a realização dos exames de rotina dos referidos pacientes, não sendo necessária punção venosa não prevista no manejo habitual do paciente, tendo o mesmo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Indivíduos controles saudáveis, com média de idade de 47 anos (28-64 anos) foram cem (100) doadores de sangue estratificados por sexo e idade pareados à população em estudo, sendo utilizadas amostras do biobanco obrigatório do banco de sangue do HSL-PUCRS. Os dados dos pacientes foram obtidos através do questionário realizado pelo hemoterapeuta na pré-triagem de rotina, sendo acrescentadas duas perguntas referentes à história: presença de doenças reumáticas articulares e não articulares e a presença de coronariopatia, sendo os portadores dessas patologias excluídos. A triagem rotineira de doadores de sangue inclui investigação de

hepatopatias virais pré-existentes, além de outras patologias de transmissão sanguínea.

Critérios de exclusão dos casos em estudo: dados obtidos dos prontuários ou base de dados/biobanco dos pesquisadores titulares:

1. Doenças endócrinas (tireopatia descompensada, hiperparatireoidismo);
2. História de AVC ou AIT nos últimos dois anos;
3. Doença renal (insuficiência renal, glomerulopatia);
4. Diátese hemorrágica;
5. Infecções virais, bacterianas ou fúngicas ativas;
6. Doenças auto-imunes;
7. Hepatopatia crônica pós-tratamento.

A COMP foi dosada por teste imunoenzimático quantitativo em fase sólida de duas fases baseado no princípio sanduíche (AnaMar Medical, Uppsala, Suécia). O sistema possui dois anticorpos monoclonais dirigidos contra determinantes antigênicos separados na molécula da COMP. Durante a incubação, a COMP da amostra reage com os anticorpos anti-COMP conjugados com peroxidase e com os anticorpos anti-COMP da fase sólida.

Como os desvios-padrão são bastante diferentes, optou-se pela utilização de um teste não-paramétrico para comparação entre os grupos. O teste escolhido foi o de *Mann-Whitney*, também conhecido pelo nome de "soma dos postos de *Wilcoxon*". O coeficiente de correlação de *Spearman* ( $\rho$ ) foi usado para medir o grau de relacionamento entre as variáveis que apresentavam, no mínimo, o nível de mensuração ordinal.

## RESULTADOS

A descrição dos dez casos selecionados neste estudo em relação as variáveis analisadas está na Tabela 1 e 2.

Entre os 10 pacientes estudados, 5 pacientes apresentaram hepatite viral C pelo genótipo 1 (50%) e 5 pelo genótipo 3 (50%). A média de AST, ALT e plaquetas foram, respectivamente, 85,6 (IC 95% 58,69 - 112,51); 119,2 (IC 95% 77,81 - 160,59) e 173100 (IC 95% 141817 - 204382). Os achados histológicos pela biópsia foram 2 pacientes com F2 (20%), 5 pacientes com F3 (50%) e 3 pacientes F4 (30%) (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1 – Amostra dos casos em estudo

Paciente	Idade	Gênero	COMP (U/l)	Gen	AST (U/l)	ALT (U/l)	Plaquetas	Fibrose
1	41	M	0,4	1	127	80	153000	4
2	50	F	1,2	1	99	153	188000	3
3	65	M	14,8	3	167	233	190000	2
4	50	F	30,0	1	61	99	101000	4
5	30	M	4,1	1	43	52	242000	2
6	60	F	6,9	3	50	55	120000	3
7	42	M	16,1	1	71	165	222000	3
8	50	F	7,2	3	69	160	199000	3
9	46	F	6,4	3	89	78	155000	3
10	49	M	8,1	3	80	117	161000	4

TABELA 2 – Estatísticas descritivas e Intervalo de Confiança (IC)

	Mínimo	Mediana	Máximo	Média	Desvio-padrão	Intervalo de Confiança para média 95%	
						LI	LS
AST	43	75,50	167	85,60	37,62	58,69	112,51
ALT	52	108,00	233	119,20	57,87	77,81	160,59
Plaquetas	101000	174500,00	242000	173100,00	43732,65	141,817,72	204,382,28

Primeiramente foi realizada a comparação entre a COMP dos dois grupos. O valor mediano da COMP do grupo controle foi de 6,60 U/l (IC 95% 6,27-7,46) enquanto o do grupo caso foi de 7,05 U/l (IC 95% 3,23-15,81). Apesar de três casos apresentarem níveis altos dessa trombospondina, a diferença entre os grupos não foi significativa ao nível de 5% (Tabela 3).

Quando analisamos o grupo caso isoladamente, através do coeficiente de Spearman ( $\rho$ ), comparando as variáveis AST, ALT, plaquetas, genótipo, grau de fibrose e valor da COMP, veri-

ficamos que há correlação apenas entre o número de plaquetas e o grau de fibrose da amostra estudada ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

TABELA 3 – Comparação da COMP entre grupos

Grupo	COMP			Teste Mann-Whitney
	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p
Controle (n = 100)	0,00	6,60	13,20	0,596
Caso (n = 10)	0,40	7,05	30,00	
Total	0,00	6,60	30,00	

Teste de Mann-Whitney.

TABELA 4 – Associação entre rho e as demais variáveis

AST	$\rho$ Valor de p	1,000					
ALT	$\rho$ Valor de p	0,527 0,117	1,000				
Plaquetas	$\rho$ Valor de p	-0,067 0,855	0,333 0,347	1,000			
Genótipo	$\rho$ Valor de p	0,104 0,774	0,104 0,774	-0,104 0,774	1,000		
Fibrose	$\rho$ Valor de p	0,079 0,828	-0,079 0,828	-0,671* 0,034	-0,151 0,677	1,000	
COMP	$\rho$ Valor de p	-0,188 0,603	0,503 0,138	-0,018 0,96	0,174 0,631	0,079 0,828	1,000
		AST	ALT	Plaquetas	Genótipo	Fibrose	COMP

\* Correlação de Spearman ao nível de 5%.

## DISCUSSÃO

Atualmente sabe-se que 85% ou mais dos indivíduos com hepatite C aguda progredirão para o estágio crônico, entre os quais, aproximadamente, 20% irão progredir para fibrose e cirrose e, entre esses, 20% desenvolverão CHC<sup>(10)</sup>.

Recentes estudos têm demonstrado que o vírus da hepatite C (HCV) pode ser classificado em vários genótipos baseado nas variações da sequência de nucleotídeos. A importância clínica do genótipo viral encontra-se na predição da resposta terapêutica ao interferon, visto que alguns trabalhos sugerem que pacientes com genótipo 1 tendem a ter pior histologia e desenvolver mais frequentemente CHC<sup>(11)</sup>. Nosso trabalho não evidenciou esta correlação entre genótipo e grau histológico de fibrose.

Em pacientes com hepatopatia crônica, a biópsia é o padrão-ouro para determinar com acurácia o estágio da doença visando um possível tratamento, prognóstico ou exclusão de outras patologias hepáticas. Entretanto, esse procedimento envolve custos, experiência profissional e está associado a complicações em 0,3% dos pacientes e a mortalidade em 0,018%<sup>(12)</sup>. A decisão de realizá-la deve levar em conta que o paciente frequentemente apresenta doença hepática avançada, com possível coagulopatia e ascite. Entre as complicações mais frequentes encontramos a hemorragia, disseminação de células neoplásicas, infecção e injúria visceral<sup>(13)</sup>. Um método laboratorial simples e não invasivo que pudesse prever o estágio de fibrose e, portanto reduzir o número de biópsias hepática seria de grande valia<sup>(1,12)</sup>. Baseados num único estudo prévio integrado (Alemanha, China e Estados Unidos) realizado por Yi Xiao e colaboradores, desenhamos esse estudo, visando avaliar os níveis séricos da COMP como um possível marcador do grau de fibrose hepática. Entretanto, os nossos resultados não evidenciaram de que a COMP se altere de um grupo controle para o grupo de casos. Embora tenhamos uma amostra populacional pequena, salientamos que Yi Xiao evidenciou em seu estudo que a expressão da COMP em tecidos hepáticos cirróticos não era significativamente diferente da expressão em tecidos hepáticos normais.

Muitos estudos atentam para razão entre as aminotransferases, por vezes em combinação com outros parâmetros laboratoriais para prever a severidade da fibrose ou cirrose he-

pática<sup>(12)</sup>. Alguns trabalhos demonstram que idade > 40 anos e a combinação de AST/ALT > 1 com contagem plaquetária < 150.000 podem detectar pacientes com fibrose severa (estágios 3 e 4). Contudo, devido à baixa sensibilidade desses parâmetros, pacientes com contagem > 150.000 ou AST/ALT < 1 ainda requerem exame histológico do fígado<sup>(1,12)</sup>. Todos os pacientes da amostra estudada apresentavam idade superior a 40 anos, o que nos impossibilitou de realizar tal correlação. A relação AST/ALT não foi meta desse estudo. A correlação entre nível de contagem de plaquetas e grau de fibrose confirmou os achados já descritos na literatura, onde quanto menor o número de plaquetas, maior o grau de fibrose. Mesmo assim, como já citado, os pacientes necessitam submeter-se à biópsia hepática.

Concluimos que mais estudos devem continuar sendo realizados na busca de marcadores séricos que possam auxiliar no diagnóstico de fibrose hepática dos pacientes portadores de hepatopatias crônicas, independente de sua etiologia.

## REFERÊNCIAS

1. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Am J Med.* 1999;107(6B):10S-15S.
2. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:961-8.
3. Adams JC. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:25-51.
4. Lahav J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1182:1-14.
5. Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, et al. Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium. *FEBS Lett.* 1997;412:249-52.
6. Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, et al. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol.* 1997;36:1151-60.
7. Recklies AD, Baillargeon L, White C. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1998;41:997-1006.
8. Riessen R, Fenchel M, Chen H, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (Thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:47-54.
9. Xiao Yi, Keeff J, Guo J, Gazdhar A, Liao Q, Di Cesare PE, et al. Cartilage oligomeric matrix protein expression in hepatocellular carcinoma and the cirrhotic liver. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:296-302.
10. Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, et al. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between

- patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology*. 1996;23:695-9.
11. Pohl A, Behling C, Oliver D, et al. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3142-6.
  12. Strassburg CP, Manns MP. Approaches to liver biopsy techniques-revisited. *Semin Liver Dis*. 2006;26:318-27.
  13. Grillo LW, Kupski C, Souza LH, et al. Valor da relação de nível de transaminases e plaquetas em prever o estágio da fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica [resumo]. *Sci Med*. 2004;14(supl 2):87.

**Endereço para correspondência:**  
JAQUELINE COSTA COELHO  
Rua Dom Diogo de Souza, 283/502  
CEP 91350-000, Porto Alegre, RS, Brasil  
Fone: (51) 3347-1307  
E-mail: jakecc@uol.com.br