UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

PATRÍCIA HOLANDA ALMEIDA

**Associação do comprimento do telômero e de mutações na região promotora
de TERT na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C
crônica.**

Ribeirão Preto

2019

PATRÍCIA HOLANDA ALMEIDA

Associação do comprimento do telômero e de mutações na região promotora de TERT na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutorado direto em
Clínica Médica, área de concentração em
Hepatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Lourdes
Candolo Martinelli

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Almeida, Patricia Holanda

Associação do comprimento do telômero e de mutações na região promotora de TERT na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica – Ribeirão Preto, 2019. 116 f.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado direto, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica - Hepatologia.

Orientador: Martinelli, Ana de Lourdes Candolo.

1. Hepatite C crônica 2. Telômeros. 3. Carcinoma hepatocelular. 4. Cirrose hepática. 5. Disfunção telomérica

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**), fundação do Ministério da Educação (MEC)
- Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Nome: ALMEIDA, Patrícia Holanda

Título: Associação do comprimento do telômero e de mutações na região promotora de TERT na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorado direto em Clínica Médica, área de concentração em Hepatologia.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico primeiramente ao meu Deus de amor mais essa vitória em minha vida!

E aos meus pais (Antônio e Rosa) que sempre me mostraram com exemplos diários a importância do estudo e do trabalho árduo e que a busca da minha felicidade deveria ser sempre o meu maior objetivo.

A minha base de AMOR, simplesmente o mais intenso e verdadeiro AMOR, é meu principal alicerce.

Agradecimentos Especiais

Agradeço especialmente a Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli por todo apoio, confiança, carinho, escuta atenta, paciência e generosidade durante toda essa caminhada. Sou imensamente grata por todos as oportunidades a mim concedidas e aprendizados adquiridos. Foi um privilégio tê-la como orientadora!

Agradeço especialmente a Raquel de Melo Alves Paiva e Flávia Sacilotto Donaires pelo valioso apoio em todas as fases desta tese, por toda paciência e prontidão! Seria impossível sem vocês! Serei eternamente grata!

Agradecimientos

A Deus pelo dom da vida e da minha saúde, por ser presença diária, constante e firme na minha caminhada.

A minha família, particularmente aos meus pais e a minha irmã, pelo apoio incondicional em todos os meus sonhos, mesmo que alguns me fizessem estar longe deles fisicamente.

Ao meu amor e parceiro de vida Caio Henrique Torres Sousa por todo amor, carinho, paciência, alegria e apoio nessa árdua caminhada. Seu incentivo diário foi fundamental. Eu te amo!

Ao Professor Dr. Rodrigo Calado por toda orientação e dedicação, por ser exemplo como pesquisador. Grata também por ter disponibilizado toda a estrutura do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP USP) para o processamento das amostras biológicas.

Aos anjos que me ajudaram no Laboratório com infinita paciência e carinho: Barbara Amélia Aparecida Santana, Fernanda Gutierrez, Ritinha, André Pinto, Gustavo Borges e João Paulo.

A amiga Dra Fernanda Fernandes por todo apoio, incentivo e amizade. Serei eternamente grata por tudo, por todos os ensinamentos!

A amiga Dra Marcia VilaNova pelo apoio, incentivo e amizade, que foram essenciais em toda essa caminhada.

A amiga Dra Roberta Chaves de Araújo, anjo que Deus me presenteou em Ribeirão, pela oportunidade de compartilhar anos de crescimento pessoal e profissional, pelo companheirismo, amor, carinho e cuidado! Serei eternamente grata!

Aos pacientes, médicos residentes, médicos assistentes e docentes da Divisão de Gastroenterologia do HCFMRP USP, pela troca de aprendizados e pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Gastroenterologia por toda presteza e colaboração para a concretização da tese: Marie, Carlos e Alice.

Aos anjos de amor, cuidado e carinho nesses anos de residência e pós-graduação da Sala de Procedimentos da Gastroenterologia: Soninha, Analia, Neia e Patricia.

Aos amigos Dra Adriana Leonarda, Dr Guilherme, Dr Sandro e Dra Andreza pelo apoio e incentivo no decorrer desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Ênio Mente, coordenador do Grupo de Transplante de Fígado do HCFMRP USP, pelo apoio e confiança, por me permitir a troca de conhecimentos e aprendizados com sua equipe.

Aos Prof. Luiz Ernesto de Almeida Troncon, Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira, Prof. Dr. Roberyo Oliveira Dantas pelos ensinamentos na minha formação em Gastroenterologia.

Epígrafe

Tu, Senhor, guardarás em perfeita paz
aquele cujo propósito está firme,
porque em ti confia.

Isaías 26:3

RESUMO

ALMEIDA, P. H. **Associação do comprimento do telômero e de mutações na região promotora de *TERT* na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.** 2019. 116 f. Tese (Doutorado direto) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Os mecanismos que favorecem a gravidade da doença hepática secundária à infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) ainda são pouco conhecidos. Entre os pacientes com os mesmos fatores de risco, alguns desenvolvem rapidamente cirrose e carcinoma hepatocelular, enquanto outros têm um curso benigno. O atrito telomérico pode levar à falência de órgãos em doenças crônicas de alta taxa de renovação celular, como a cirrose hepática. A lesão celular crônica na infecção pelo HCV ativa, persistentemente, o sistema de reparo tecidual e o ciclo celular dos hepatócitos, o que pode provocar o encurtamento dos telômeros. No câncer de fígado, as mutações e alguns polimorfismos de nucleotídeo único no promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERTp) são indicativos de mau prognóstico. Nós hipotetizamos que o comprimento dos telômeros (CT) e as variantes genéticas no TERTp poderiam ser marcadores para a gravidade das doenças hepáticas secundárias à infecção pelo HCV. Foram medidos CT em 82 amostras de sangue e biópsias hepáticas de pacientes com HCV e 181 amostras de sangue de indivíduos saudáveis. Os tecidos hepáticos de 52 pacientes com HCV foram avaliados quanto a presença de variantes genéticas no TERTp. A coorte de HCV foi composta por 82,9% dos homens. A idade média dos pacientes com HCV e dos controles foi de 49,2 anos ($\pm 10,8$) e 36,4 ($\pm 13,7$) anos, respectivamente. De acordo com a classificação METAVIR, 70,7% eram F1 / F2 e 29,3% eram F3 / F4. A média de CT foi de $0,8 \pm 0,3$ no sangue de indivíduos saudáveis, de $0,7 \pm 0,2$ em pacientes com HCV com F1 / F2 e de $0,7 \pm 0,2$ com F3 / F4. CT de tecido hepático foi de $1,3 \pm 0,5$ em F1 / F2 e $1,2 \pm 0,3$ em F3 / F4. A diferença do CT não foi estatisticamente significativa nos níveis de gravidade da doença no sangue e no tecido hepático ($p = 0,9$ para ambos). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no TERTp rs2853669 foi encontrado em 33,6% dos pacientes com HCV e foi mais frequente na fibrose leve (37,1% no F1 / F2) do que na forma mais grave (26,5% no F3 / F4). Concluimos que na infecção crônica pelo VHC, o comprimento dos telômeros não parece interferir como um fator independente na gravidade da doença hepática. O SNP rs2853669 foi encontrado enriquecido em pacientes com fibrose mais leve, sugerindo que esse SNP pode estar associado a um melhor prognóstico.

Palavras-chave: Telômero. Cirrose hepática. Telomerase. Fibrogênese hepática.

ABSTRACT

ALMEIDA, P. H. **Association of telomere length and mutations in the TERT promoter region in the progression of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C.** 2019. 116 f. Tese (Doutorado direto) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Background and aims: The mechanisms favouring the severity of liver disease secondary to hepatitis C virus (HCV) infection are still poorly understood. Among patients with the same known risk factors, some develop rapidly cirrhosis and hepatocellular carcinoma, while others have a benign course. Accelerated telomere attrition is a putative factor that leads to end-stage organ failure in chronic diseases of high cellular turnover such as liver cirrhosis. Chronic cellular injury in HCV infection persistently activates tissue repair system and hepatocyte cell cycle, which may provoke telomere shortening. In liver cancer, mutations and some single nucleotide polymorphisms in the telomerase reverse transcriptase promoter (TERTp) are indicative of poor prognosis. We hypothesized whether telomere length (TL) and genetic variants in the *TERTp* would be markers for severity of liver diseases secondary to HCV infection. **Methods:** We measured TL in 82 blood samples and liver biopsies of HCV patients and 181 blood samples of healthy subjects. Hepatic tissues of 52 HCV patients were screened for genetic variants in the *TERTp*. **Results:** HCV cohort was composed of 82.9% of males. The mean age of HCV patients and control subjects was 49.2 years (± 10.8) and 36.4 (± 13.7) years, respectively. According to the METAVIR classification, 70.7% were F1/F2 and 29.3% were F3/F4. Mean of TL was 0.8 ± 0.3 in blood of healthy subjects, 0.7 ± 0.2 in HCV patients with F1/F2, and 0.7 ± 0.2 with F3/F4. TL of hepatic tissue was 1.3 ± 0.5 in F1/F2 and 1.2 ± 0.3 in F3/F4. TL difference was not statistically significant in the severity levels of the disease in blood and hepatic tissue ($p=0.9$ for both). The single nucleotide polymorphism (SNP) in the TERTp rs2853669 was found in 33.6% of HCV patients, and was more frequent in mild fibrosis (37.1% in F1/F2) than in the most severe form (26.5% in F3/F4). **Conclusion:** In chronic HCV infection, the telomere length does not appear to interfere as an independent factor in liver disease severity. The SNP rs2853669 was found enriched in patients with milder fibrosis, suggesting that this SNP may be associated with a better prognosis.

Key words: Telomere. Hepatic cirrhosis. Telomerase. Fibrogenese hepatica.

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)	75
Tabela 2 - Dados referentes a avaliação das alterações enzimáticas e da função hepática dos pacientes com hepatite C crônica. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).	76
Tabela 3 - Análise de regressão linear simples e ajustada das variáveis clínicas e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).....	79
Tabela 4 - Análise de regressão linear simples e ajustada das variáveis clínicas dos pacientes portadores de HCV e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52)	80
Tabela 5 - Análise de regressão linear simples e ajustada das características laboratoriais dos pacientes portadores de HCV e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).....	80
Tabela 6 - Análise de regressão linear simples e ajustada das características laboratoriais dos pacientes portadores de HCV e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).....	81
Tabela 7 - Características histológicas dos pacientes com HCV e a análise de correlação estatística com o comprimento do telômero em sangue periférico (CTs). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)	82
Tabela 8 - Razão T / S no sangue periférico e gravidade da doença hepática em portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).....	83
Tabela 9 - Características histológicas dos pacientes com HCV e a análise de correlação estatística com o comprimento do telômero em tecido hepático (CTf). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).	85
Tabela 10 - Razão T / S no tecido hepático e gravidade da doença hepática em portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).....	85
Tabela 11 - Pós teste de Turkey para análise da CTf (razão T / S) e a gravidade da doença hepática em portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).	85

Tabela 12 - Análise de regressão logística bruta e ajustada por T/S no fígado e em sangue periférico.....87

Tabela 13 - SNP (Single Nucleotide Polymorphism) na região TERTp (rs2853669) nos pacientes com HCV e na população (grupo controle).....88

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo a região de residência e o ano de notificação. Brasil, 2007-2017	34
Figura 2 - Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo o sexo, a razão de sexos e o ano de notificação. Brasil, 2003-2017	35
Figura 3 - Proporção de casos de hepatite C segundo a provável fonte de infecção e o ano de notificação. Brasil, 2003-2017	36
Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por hepatite C segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2006-2016.....	37
Figura 5 - Microfotografia do vírus da hepatite C	38
Figura 6 - Figura esquemática do vírus da hepatite C.....	38
Figura 7 - Esquema do genoma do HCV e das proteínas virais.....	40
Figura 8 - Distribuição dos genótipos do HCV no mundo.....	42
Figura 9 - Distribuição dos genótipos do HCV no Brasil.....	42
Figura 10 - História natural da infecção pelo HCV.	44
Figura 11 - Estrutura dos telômeros	49
Figura 12 - Relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação celular.....	50
Figura 13 - Classificação de METAVIR para fibrose hepática.....	62
Figura 14 - Aparelho de Espectrofotometria <i>NanoVue</i> (GE <i>Healthcare Life Sciences</i>) – utilizado para quantificação de DNA das amostras	66
Figura 15 - Gel de agarose (1,5%) – processo de verificação da qualidade do DNA extraído	66
Figura 16 - Resultado da aplicação das amostras em Gel de agarose (1,5%) – bandas únicas e fortes	67

Figura 17 - Aparelho de Fluorometria Qubit (<i>Qubit Fluorometric Quantitation</i>) - utilizado para averiguação aleatória das quantificações de DNA prévias	67
Figura 18 - Pipetador automatizado <i>QIAgility</i> (Qiagen, Califórnia, EUA).....	69
Figura 19 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica incluídos no estudo de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos e com a possibilidade de avaliação de material biológico. Ribeirão Preto (São Paulo), 2015-2016.....	74
Figura 20 - Correlação entre variável “Sexo” e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).	77
Figura 21 - Correlação entre variável “Sexo” e o comprimento do telômero medido no tecido hepático (CTf) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52). 78	
Figura 22 - Correlação entre variável “Faixa etária” e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).	78
Figura 23 - Correlação entre variável “Faixa etária” e o comprimento do telômero medido no tecido hepático (CTf) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).....	79
Figura 24 - Distribuição do comprimento dos telômeros emparelhados por idade no sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=181) e de pacientes com HCV (n=82). Ribeirão Preto (São Paulo).....	83
Figura 25 - Distribuição do comprimento dos telômeros emparelhados em idade no sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=181) e tecidos do fígado de pacientes com HCV (n=52). Ribeirão Preto (São Paulo).	86

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista das proteínas estruturais e não estruturais do VHC com suas respectivas funções.....41

Quadro 2 - Sistema de pontuação histológica dos depósitos de ferro em hepatócitos sinusóides e tratos portais.....63

Quadro 3 - Sequência dos *primers* utilizados no método qPCR para amplificação do Telômero e *Single Gene* (36B4).....68

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABraOM	Arquivo <i>Online</i> de Mutações Brasileiras
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEH	Células estreladas hepáticas
CHC	Carcinoma hepatocelular
CT	Comprimento do telômero
CTf	Comprimento do telômero em tecido hepático
CTs	Comprimento do telômero em sangue periférico
DAAAs	Antivirais de ação direta
DKC1	Gene que codifica a proteína discernia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
E	Envelope
ECM	Matriz extracelular
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gamaglutamiltransferase
HAI	Atividade necro-inflamatória
HBV	Vírus da hepatite B
HCFMRP USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HCV	Vírus da hepatite C
HCV-RNA	Ácido ribonucleico do vírus C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
IAH	Índice de atividade inflamatória
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corpórea
INR	Internacional normalized ratio
IST	Índice de saturação de transferrina
LDL	Low Density Lipoproteins

LSN	Limite superior da normalidade
MEC	Ministério da Educação
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCR	Regiões não codificantes
NS	Não estrutural
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Proteína de membrana
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POT1	Proteína de proteção aos telômeros 1
qPCR	PCR quantitativo ou PCR em tempo real
RAP1	Proteína de ativação/repressão 1
Razão T/S	Razão entre telômero e “single gene”
RNA	Ácido ribonucleico
RNA HCV	Ácido ribonucleico do vírus HCV
rpm	Rotações por minuto
RR	Risco relativo
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TERC	Componente de RNA do complexo da telomerase
TERT	Telomerase transcriptase reversa
TERTp	Região promotora de TERT
TIN2	Proteína de interação com TRF-1
TL	Telomere Length
TPP1	Proteína de organização entre POT1 e TIN2
TRF1	Fator 1 de ligação a repetições teloméricas
TRF2	Fator 2 de ligação a repetições teloméricas
UV	Radiação ultravioleta
VHB	Vírus da hepatite B

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
Kg	quilogramas
m	metros
%	porcentagem
mL	mililitros
m ²	altura
kb	quilobases
N°	número
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
1.1 O vírus da hepatite C.....	33
1.1.1 Aspectos históricos	33
1.1.2 Epidemiologia do vírus da hepatite C.....	33
1.1.3 Estrutura do vírus da hepatite C	37
1.1. 4 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C	43
1.2 Fibrose Hepática.....	44
1.3 Fatores de risco para a progressão da doença hepática.....	46
2 TELÔMERO E A TELOMERASE	48
3 HIPÓTESE	55
4 OBJETIVOS	57
5 PACIENTES E MÉTODOS	59
5.1 Desenho do estudo	59
5.2 Pacientes.....	59
5.3 Critérios de exclusão	60
5.4 Seleção dos pacientes	60
5.4.1 Grupo de pacientes	60
5.4.2 Avaliação da histologia hepática	62
5.5 Grupo controle.....	63
6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	65
6.1 Extração de DNA das amostras de biópsias hepáticas estocadas a -80°C e de leucócitos de sangue periférico.....	65
6.2 Quantificação do DNA.....	65
6.3 Avaliação do comprimento do telômero em amostras de fígado e em leucócitos de sangue periférico.....	67

6.4 Sequenciamento genético para pesquisa das mutações na região promotora de TERT	69
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
8 RESULTADOS.....	74
8.1 Características gerais dos pacientes	75
8.2 Características laboratoriais dos pacientes	75
8.3 Variáveis clínicas/ laboratoriais e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs) e em tecido hepático (CTf)	77
8.4 Achados histológicos	81
8.4.1 Achados histológicos e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs).	81
8.4.2 Achados histológicos e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf).	83
8.4.3 Análise das variáveis clínicas e laboratoriais tendo como desfecho final grau de fibrose hepática	86
8.4.4 Sequenciamento genético e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf)	87
9 DISCUSSÃO	90
10 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	104

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da hepatite C

1.1.1 Aspectos históricos

A descoberta do vírus da hepatite C (HCV) ocorreu em 1989, após extensa pesquisa para encontrar as causas de hepatite pós-transfusional (CHOO *et al.*, 1989). Desde os anos 70 havia suspeita da existência do HCV devido à ocorrência de hepatite crônica secundária ao agente infeccioso, diferente do vírus A e B, já conhecidos e que era frequentemente transmitido por sangue e produtos sanguíneos.

Inicialmente denominada hepatite não-A não-B, a hepatite C foi elucidada em 1989, quando o HCV foi identificado a partir de um *pool* de plasma de chimpanzés previamente infectados com soros de pacientes com hepatite crônica não-A não-B (CHOO *et al.*, 1989).

1.1.2 Epidemiologia do vírus da hepatite C

As hepatites virais são uma das maiores causas de transplantes hepáticos no mundo – com destaque para o HCV. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, somente em 2015, cerca 1,75 milhão de pessoas foram infectadas com o HCV, elevando o número total de indivíduos vivendo com HCV no mundo para 71 milhões de pessoas em todos os continentes (PETRUZZIELLO *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O relatório global sobre hepatites de 2017 da OMS indica que a grande maioria dessas pessoas não tem acesso aos testes e aos tratamentos que podem salvar vidas. Como resultado, milhões estão em risco de progressão para doença hepática crônica, o câncer e a morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A OMS declarou em 2017 a distribuição da prevalência da hepatite C no mundo conforme exposto a seguir:

- Região do Mediterrâneo Oriental: 2,3% da população (15 milhões)
- Região Europeia: 1,5% da população (14 milhões)
- Região Africana: 1% da população (11 milhões)
- Região das Américas: 1% da população (7 milhões)

- Região do Pacífico Ocidental: 1% da população (14 milhões)
- Região do Sudeste Asiático: 0,5% da população (10 milhões).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, entre 1999 a 2017, foram notificados no Brasil 331.855 casos com um dos marcadores de hepatite C – seja anti-HCV ou HCV-RNA – reagentes. Entretanto, quando se considerou os casos que possuíam ambos os marcadores anti-HCV e HCV-RNA reagentes, foram notificados 160.105 casos (BRASIL, 2018).

A hepatite C crônica é considerada uma doença com alta taxa de morbimortalidade; desde maio de 2016 a OMS vem trabalhando com o objetivo de eliminá-la como um problema de saúde pública mundial até 2030 e o Ministério da Saúde do Brasil pactuou esse compromisso com a OMS.

Observa-se, desde 2015, uma maior tendência de elevação na taxa de detecção em todas regiões do Brasil, quando aconteceram maiores esforços e estímulos ao diagnóstico e ao tratamento da hepatite C crônica, com obrigatoriedade da notificação da doença para a prescrição dos antivirais de ação direta (DAAs) (BRASIL, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo a região de residência e o ano de notificação. Brasil, 2007-2017

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Sistema de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (Sinan/SVS/MS), 2018.

Informa-se que até 2014 eram considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentavam ambos os testes anti-HCV e HCV-RNA (ácido ribonucleico do vírus C); a partir de 2015, passaram a ser considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentavam pelo menos um desses testes.

Na análise da distribuição dos casos notificados com anti-HCV e HCV-RNA reagentes por regiões, 63,2% destes ocorreram no Sudeste, 25,2% no Sul, 5,9% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte. No que tange a distribuição de acordo com o sexo, inicialmente houve uma maior prevalência no sexo masculino, embora essa diferença fosse diminuindo ao longo dos anos analisados (BRASIL, 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo o sexo, a razão de sexos e o ano de notificação. Brasil, 2003-2017

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Sistema de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (Sinan/SVS/MS), 2018.

Quanto ao provável mecanismo de infecção, ressalta-se a falta de informação em 53,7% dos casos notificados no Brasil, tornando difícil essa avaliação. Verificou-se que o maior percentual de provável fonte de infecção foi referente ao uso de drogas (13,2%), seguido de transfusão sanguínea (11,4%) e de relação sexual desprotegida (8,9%). Em 2017, a proporção de infecções por via sexual (9,2%) foi superior ao percentual de infecções relacionadas ao uso de drogas (8,1%). Observou-se, também, uma queda do percentual relacionado à via transfusional ao

longo dos anos; em 2017 a proporção de infecções por via transfusional foi de 6,8% (BRASIL, 2018) (Figura 3).

Atualmente, as injeções inseguras usadas em cuidados de saúde e o consumo de drogas injetáveis são consideradas as rotas mais comuns de transmissão do HCV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Figura 3 - Proporção de casos de hepatite C segundo a provável fonte de infecção e o ano de notificação. Brasil, 2003-2017

Nota: Outros: tratamento cirúrgico + tratamento dentário + pessoa/pessoa.

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Sistema de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (Sinan/SVS/MS), 2018.

A principal forma clínica dos casos de hepatite C notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foi a crônica – acima de 65% dos casos em todas as faixas etárias. A forma fulminante da doença é rara, representada por apenas 0,2% dos casos.

Os óbitos por hepatite C são considerados as maiores causas de morte entre as hepatites virais. De 2000 a 2016, foram identificados 50.179 óbitos associados à hepatite C, e esse número vem aumentando ao longo dos anos em todas as regiões do Brasil (BRASIL, 2018) (Figura 4).

Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por hepatite C segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2006-2016

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Sistema de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (Sinan/SVS/MS), 2018.

1.1.3 Estrutura do vírus da hepatite C

O HCV é um vírus de RNA (ácido ribonucleico) da família *Flaviviridae* e constitui um gênero isolado *Hepacivirus* (SHUKLA; HOYNE; WARD, 1995).

Sua partícula viral mede entre 55 e 65 nm (nanômetro) de diâmetro (Figura 5) (KAITO *et al.*, 1994) e é formada por: um envelope lipídico, onde se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2; um capsídeo proteico formado pela proteína viral Core; e o genoma viral constituído por um RNA linear, de fita simples, com polaridade positiva (FALCÓN *et al.*, 2017; YANG; YOO; AHMED, 2017) (Figura 6).

Esse RNA viral mede 9,6 kilobases de comprimento do qual cerca de 96% é traduzido. Nessa sequência, observa-se uma região de leitura aberta, que codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada posteriormente por proteases celulares e virais, dando origem as proteínas do vírus (IMBERT *et al.*, 2004; ISHII; KOZIEL, 2008) (Figura 7).

Figura 5 - Microfotografia do vírus da hepatite C

Fonte: *The C. Everett Koop Institute*, 2014.

Figura 6 - Figura esquemática do vírus da hepatite C

Fonte: *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, vol.34, 2001.

Há ainda regiões não codificantes (NCR) nas extremidades 5' e 3', sendo importantes no processo de replicação e detecção de diferentes genótipos (SHEHAB, 2004; DUBUISSON; COSSET, 2014). Na Figura 7 está representado o esquema do genoma do HCV.

Essa poliproteína, gerada após a infecção, será clivada e dará origem a três proteínas estruturais: core, E1 e E2 (proteínas do envelope), p7 e sete proteínas não estruturais ou NS (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), essas últimas responsáveis pela replicação viral (STRAUSS, 2001; KOUTSOUDAKIS *et al.*, 2012) (Quadro 1).

As proteínas do envelope (E1 e E2) são componentes essenciais do envelope viral, responsáveis pela entrada e fusão viral, estando envolvidas na replicação viral e secreção do vírus (LINDENBACH; RICE, 2013). O heterodímero E1 / E2 é o principal alvo da resposta humoral durante a infecção pelo VHC (SAUTTO *et al.*, 2013; BALL; TARR; MCKEATING, 2014). A imunogenicidade de E1 / E2 impulsiona as pesquisas visando ao desenvolvimento de vacinas (HOUGHTON, 2011). A proteína p7, proteína integrante de membrana, ainda é pouco conhecida. Estudos *in vitro* sugerem que a p7 pertence à família de viroporinas e que poderia atuar como um canal íon cálcio (GONZALEZ; CARRASCO, 2003) (Quadro 1).

As proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação viral. A NS3 contém atividade de protease, RNA helicase e nucleosídeo trifosfatase (NTPase), que são essenciais para a replicação viral. A NS5B é uma RNA polimerase RNA-dependente, enzima importante para a transcrição e a replicação. A inibição das funções da NS3 e NS5 constitui-se nos principais mecanismos de ação dos antivirais de ação direta contra o HCV (DUBUISSON; COSSET, 2014) (Quadro 1 e Figura 7).

O HCV replica-se, preferencialmente, no citoplasma de hepatócitos, embora sua presença também tenha sido descrita em outros compartimentos (células mononucleares de sangue periférico, plaquetas, células dendríticas ou sistema nervoso central) (GOUTAGNY *et al.*, 2003; FORTON; THOMAS; TAYLOR-ROBINSON, 2004; RAMIREZ *et al.*, 2009; ARIEDE, 2013).

A análise comparativa das sequências genômicas virais isoladas em diferentes áreas geográficas identificou heterogeneidade genômica, pois existem 7 genótipos, denominados de 1 a 7 de acordo com a ordem da descoberta e mais de 67 subtipos de HCV (SMITH *et al.*, 2014; KARTASHEV *et al.*, 2016; PETRUZZIELLO *et al.*, 2016). Os diferentes genótipos diferem uns dos outros em 30-35% dos nucleotídeos (nt). Além disso, cada um desses genótipos é dividido em subtipos, que diferem entre si por 20-25% da sequência nt e são identificados por letras, por exemplo, 1 a, 1 b, 2 a, 2 b, 3 a, etc... (KUIKEN; SIMMONDS, 2009).

O HCV também varia ao nível de quasiespecies (MARTELL *et al.*, 1992; FARCI; BUKH; PURCELL, 1997; POWDRILL *et al.*, 2011). Este termo refere-se à diversidade existente entre o vírus que circula dentro do mesmo indivíduo. A diversidade de sequências é gerada continuamente durante a replicação viral, porque a polimerase viral não tem capacidade de correção de erros (1 erro a cada 10⁴ ou 10⁵ nt) e a taxa

de produção de novos virions é muito alta (1012 virions por dia) resultando em grande população viral (NEUMANN *et al.*, 1998; CUEVAS *et al.*, 2009).

Figura 7 - Esquema do genoma do HCV e das proteínas virais

Fonte: Adaptado de *Wikimedia Foundation*, 2014.

Quadro 1 - Lista das proteínas estruturais e não estruturais do VHC com suas respectivas funções

Proteínas	Descrição e funções
Core	Nucleocapsídeo viral
E1 e E2	Proteínas do envelope viral; replicação viral
P7	Viroporina; canal de cálcio
NS2	Protease
NS3	Protease, RNA helicase, nucleosídeo trifosfatase
NS4A	Cofator para atividade de NS3
NS4B	Proteína hidrofílica, integrante de membrana; formação do complexo de replicação RNA HCV
NS5A	Proteína polifosforilada; formação do complexo de replicação RNA HCV, responsável pela sensibilidade de HCV ao interferon
NS5B	RNA polimerase RNA-dependente; transcrição e replicação viral

E: envelope; P: proteína de membrana; NS: não estrutural; RNA: ácido ribonucleico; RNA HCV: ácido ribonucleico do vírus HCV

A distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HCV varia de acordo com a rota de transmissão e de localização geográfica (ROMAN *et al.*, 2008). Os genótipos 1, 2 e 3 mostram uma distribuição generalizada em quase todas as partes do mundo. O genótipo 4 do HCV tem sido tradicionalmente restrito a poucos países do Oriente Médio e da África e é mais prevalente na Arábia Saudita, Bahrein, Jordânia, Egito e Etiópia. Os genótipos 5, 6 e 7 do HCV foram relatados na África do Sul, Sudeste Asiático e Central África, respectivamente (AL-KUBAISY *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2015; NOUROZ *et al.*, 2015) (Figura 8).

O genótipo 1 do HCV é o mais prevalente em todo o mundo (49,1%), seguido do genótipo 3 (17,9%), 4 (16,8%) e 2 (11,0%). Os genótipos 5 e 6 são responsáveis pelo restante (<5%). Enquanto genótipos 1 e 3 são comuns em todo o mundo, a maior proporção dos genótipos 4 e 5 está em países de baixa renda (PETRUZZIELLO *et al.*, 2016) (Figura 8).

No Brasil, o genótipo mais prevalente é o 1 (50 a 60% dos casos), seguido do genótipo 3 (35% dos casos) e do 2 (2 a 3% dos casos). Em algumas regiões existem algumas particularidades, como na região Centro-Oeste, onde há maior prevalência do genótipo 2, 11% dos casos, e na região Sul onde o genótipo 3 é mais frequentemente detectado, 43% dos casos. Genótipos 4 e 5 são muito raros (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007) (Figura 9).

Figura 8 - Distribuição dos genótipos do HCV no mundo

Fonte: *International Journal of Molecular Sciences*, dezembro/2017.

Figura 9 - Distribuição dos genótipos do HCV no Brasil

Fonte: Adaptada de Duarte, 2006.

1.1. 4 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C

A infecção pelo HCV pode ter curso agudo ou crônico no hospedeiro. De modo geral, a hepatite C aguda apresenta evolução subclínica. A maioria dos casos têm apresentação assintomática, o que dificulta o diagnóstico. Os pacientes sintomáticos (20 a 30%) apresentam sintomas inespecíficos tais como anorexia, astenia, febre, mal-estar e dor abdominal. Uma menor parte dos pacientes apresenta icterícia ou colúria (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Casos de insuficiência hepática ou casos fulminantes, são extremamente raros (FARCI; BUKH; PURCELL, 1997; BRASIL, 2018).

A eliminação viral espontânea após a infecção aguda pelo HCV pode ocorrer em 15% a 40% dos casos. A fase aguda da hepatite C pode durar até seis meses, mas sua resolução costuma acontecer até a 12ª semana. Aproximadamente 80% dos pacientes que persistem com o HCV, por mais de 6 meses, são considerados portadores de hepatite C crônica (GREBELY; MATTHEWS; DORE, 2011).

Habitualmente, a hepatite C é diagnosticada em sua fase crônica. Como os sintomas são escassos e inespecíficos e costumam ocorrer somente em 20% dos pacientes e apenas nas fases avançadas da doença, esta morbidade pode evoluir durante décadas sem diagnóstico, o que reitera a importância da suspeição clínica e do aumento da oferta de diagnóstico sorológico – especialmente para as populações vulneráveis ao HCV (AFDHAL, 2004; MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2009).

A persistência da inflamação por muitos anos promove progressiva fibrose do parênquima hepático e, após cerca de 20 a 30 anos de doença, 20% dos pacientes podem evoluir para cirrose. Uma vez estabelecido o diagnóstico de cirrose hepática, o risco anual para o surgimento de CHC (carcinoma hepatocelular) é de 1% a 5%. O risco anual de descompensação hepática é de 3% a 6%. O risco de óbito após um primeiro episódio de descompensação hepática nos próximos 12 meses é de 15% a 20% (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014) (Figura 10).

A infecção crônica pelo HCV é capaz de causar algumas manifestações extra-hepáticas, como glomerulonefrite, diabetes mellitus, distúrbios da tireoide, porfiria cutânea tardia, crioglobulinemia mista, líquen plano e distúrbios linfoproliferativos relacionados às células B (GALOSSO *et al.*, 2007; JADOON *et al.*, 2010). Essas complicações extra-hepáticas podem ofuscar as manifestações hepáticas e a presença da infecção pelo VHC pode ser negligenciada nesses cenários.

Figura 10 - História natural da infecção pelo HCV

Fonte: Autoria própria (2018).

1.2 Fibrose Hepática

A fibrose hepática é definida pelo acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (ECM), tais como colágeno, laminina, elastina, fibronectina, entre outros, o qual envolve células parenquimatosas e não parenquimatosas, além de infiltrar células imunes. O objetivo da fibrogênese hepática é conter o dano ao tecido. No entanto, na persistência do fator agressor, o processo perpetua-se, podendo culminar com a completa destruição da arquitetura hepática, impactando nas funções do órgão (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002; BATALLER; BRENNER, 2005; KISSELEVA; BRENNER, 2006). Atualmente, a fibrose hepática é considerada como uma resposta cicatricial à lesão hepática crônica (BATALLER; BRENNER, 2005; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014).

A inflamação crônica resulta em acúmulo de ECM e substituição de colágeno de baixa densidade (tipo IV) pelo de alta densidade (tipo I) no espaço subendotelial de Disse (FRIEDMAN; BANSAL, 2006).

As células estreladas hepáticas (CEH) são consideradas os principais elementos fibrogenéticos. Elas são de origem mesenquimal, encontradas na região perisinusoidal e correspondem a 15% das células no fígado normal. Essas células

possuem 80% do estoque de vitamina A (retinóides) do corpo humano, sendo responsáveis pela homeostase da matriz extracelular no fígado normal e pela regulação do fluxo sanguíneo sinusoidal (FRIEDMAN, 2003; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014).

Embora quiescente na ausência de estímulos inflamatórios, as CEH são ativadas em resposta à lesão hepática e transformam-se em miofibroblastos proliferativos e contráteis, a forma ativada, que tem a forma de uma estrela e é pobre em vitamina A. CEH ativadas constituem a fonte predominante de produção de ECM, desse modo, rompem o equilíbrio entre a deposição e a dissolução de proteínas da ECM, o que leva ao acúmulo de tecido fibrótico e, posteriormente, à cirrose hepática (FRIEDMAN, 2003; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014).

Evidências experimentais sugerem que proteínas estruturais (Core, E1 e E2), assim como as não-estruturais do HCV são responsáveis, diretamente, pela ativação de CEH e, assim, pelo início da fibrogênese (SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014). Essa ativação do sistema de reparação, representado especialmente pelas CEH, tem como principal função limitar o dano ao parênquima.

Na hepatite C crônica, como em outras doenças crônicas que acometem o parênquima hepático, o depósito de fibrose inicia-se no espaço portal (zona 1 de Rappaport) e vai se estendendo pelo parênquima até a veia centro-lobular (zona 3 de Rappaport), formando pontes, septos de tecido fibroso e os nódulos de regeneração (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002; SEBASTIANI; GKOUVATSOS; PANTOPOULOS, 2014).

O estresse oxidativo é um componente chave da fibrose hepática (CHOI; OU, 2006). Células parenquimatosas apoptóticas são fagocitadas por CEH ativadas resultando na ativação da NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidase. Além disso, o ácido desoxirribonucleico (DNA) de hepatócitos apoptóticos pode interagir com CEH, aumentando a produção e deposição de colágeno.

Esse acúmulo progressivo de ECM no espaço de Disse culmina com uma disfunção hepatocelular, manifestada clinicamente por disfunção hepática e complicações da hipertensão portal (ascite, encefalopatia hepática, hemorragia digestiva, peritonite bacteriana espontânea, síndrome hepatorrenal e síndrome hepatopulmonar) (FRIEDMAN; BANSAL, 2006).

Após 20 a 30 anos de doença, 1 a 5% dos portadores de fibrose avançada evoluem com carcinoma hepatocelular.

A progressão da doença não é linear em todos os pacientes. Entre aqueles com os mesmos fatores de risco, alguns desenvolvem fibrose avançada rapidamente e carcinoma hepatocelular, enquanto outros têm uma progressão mais lenta e benigna (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002; AFDHAL, 2004).

Alguns estudos indicam potencial reversibilidade da fibrose hepática quando o agente causal da injúria é removido. A reversão da fibrose hepática é caracterizada pela diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias e pró-fibrogênicas, superexpressão de proteínas pró-apoptóticas (p53, Bax e Bcl-2), maior atividade da colagenase e desaparecimento dos miofibroblastos. Durante a resolução da fibrose hepática, por ativação da cascata das caspases, as CEH e miofibroblastos sofrem senescência e apoptose. A conversão de macrófagos e a produção de metaloproteinases ajudam a degradar e fagocitar a ECM existente (KISSELEVA; BRENNER, 2006; LIU *et al.*, 2013; CAMPANA; IREDALE, 2017). Atualmente a fibrose hepática é considerada um processo bidirecional, potencialmente reversível e novos estudos nessa área estão em andamento com o objetivo de desenvolver novas terapias antifibrogênicas (CAMPANA; IREDALE, 2017).

1.3 Fatores de risco para a progressão da doença hepática

Sabe-se que 15-30% dos pacientes com HCV evoluem para a cirrose hepática em, aproximadamente, três décadas. Vários fatores são reconhecidos por aumentar a velocidade do desenvolvimento da fibrose, tais como: a duração da infecção, a idade do paciente na época da exposição ao vírus (progressão mais rápida naqueles que adquirem a infecção com mais de 40 anos), o sexo masculino, a presença de esteatose hepática, o sobrepeso e a obesidade, a coinfeção com o vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), a imunocompetência do hospedeiro e o consumo de etanol maior que 50g/dia (THEIN *et al.*, 2008).

Em estudo na população brasileira, Sousa (2007) observou como fatores de risco independentes associados à fibrose hepática grave, em análise multivariada: o índice de massa corpórea (IMC) ≥ 25 Kg/m², a idade mais avançada no momento da biópsia hepática, a atividade necro-inflamatória (HAI) ≥ 9 , os níveis mais elevados de gama glutamiltranspetidase (GGT) e a contagem global de plaquetas mais baixa. E, como fatores independentes de risco associados ao tempo de evolução para cirrose

inferior a 30 anos, a HAI ≥ 9 , a presença de esteatose hepática e a contagem global de plaquetas mais baixa.

Observa-se diferentes evoluções da doença hepática entre os pacientes com os mesmos fatores de risco. Nesse contexto, evidências apoiam o papel de fatores imunológicos, genéticos e epigenéticos como coadjuvantes no processo. Com o objetivo de compreender melhor a patogênese da doença, alguns modelos de formação de cirrose já foram estabelecidos (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002; AFDHAL, 2004).

Uma hipótese indica que a cirrose é desenvolvida como consequência da deposição progressiva do colágeno e cicatrização tecidual induzida pela inflamação crônica e necrose (HARTMANN *et al.*, 2011). Outras hipóteses referem-se ao atraso na proliferação dos hepatócitos, levando às alterações nas interações entre hepatócitos-matriz e a inibição do crescimento pelo fator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (HEMANN *et al.*, 2001). Outra hipótese, ainda, indica que o encurtamento dos telômeros pode ter um papel para a evolução de formas mais graves nos pacientes com doença hepática crônica (KOJIMA *et al.*, 1997; HEMANN *et al.*, 2001; WIEMANN *et al.*, 2002; LAZZERINI DENCHI; CELLI; DE LANGE, 2006).

Além disso, os estudos em animais com deficiência de telomerase fornecem a primeira evidência experimental que o encurtamento dos telômeros limita a resposta regenerativa ao dano hepático agudo e crônico, acelerando a formação de fibrose hepática e esteatose (HEMANN *et al.*, 2001).

A relação entre o encurtamento telomérico e a cirrose em humanos foi demonstrada por Kitada *et al.* 1995. Condições com alto *turnover* celular, como a lesão hepática crônica, aceleram o processo de encurtamento telomérico, levando ao prejuízo da proliferação celular.

Subsequentemente, estudos associaram o comprimento do telômero e a gravidade da fibrose hepática, sugerindo o comprimento telomérico como marcador de cirrose (URABE *et al.*, 1996; AIKATA *et al.*, 2000). Estes achados sugerem que as mutações na telomerase podem acelerar a progressão para a cirrose em pacientes com lesão hepática crônica.

2 TELÔMERO E A TELOMERASE

A primeira descrição funcional dos telômeros foi realizada pelo geneticista Hermann Muller, quando ele usou raios-X para fragmentar cromossomos. Muller, trabalhando com moscas das frutas, e Barbara McClintock, com milho, concluíram: as extremidades naturais dos cromossomos são diferentes daquelas geradas por quebra cromossômica (BLACKBURN; GREIDER; SZOSTAK, 2006). Os “fins naturais” são de alguma forma protegidos dos rearranjos frequentes que ocorrem em extremidades cromossômicas quebradas.

Em 1938, Muller nomeou os “fins naturais” dos cromossomos de “telômeros” (MULLER, 1938). No entanto, nem Muller e nem McClintock tinham as ferramentas para entender a natureza molecular destas extremidades cromossômicas. E, em 1953, tornou-se possível compreender a estrutura do DNA dos telômeros (WATSON; CRICK, 1953).

Em 1975, Liz Blackburn iniciou inúmeros experimentos, utilizando o protozoário *Tetrahymena thermophila*, a fim de conhecer melhor a estrutura e a funcionalidade dos telômeros. Esses estudos permitiram descobrir, na década de 80, que os telômeros constituem-se em um complexo desoxirribonucleoprotéico, localizado nas extremidades de cromossomos eucarióticos envolvidos por um grupo de, pelo menos, seis proteínas específicas (TRF1 - Fator 1 de ligação a repetições teloméricas, TRF2 Fator 2 de ligação a repetições teloméricas, TIN2 - Proteína de interação com TRF-1, POT1– Proteína de proteção aos telômeros 1, RAP1- Proteína de ativação/repressão 1, e TPP1– Proteína de organização entre POT1 e TIN2), denominadas “shelterin” ou telossomos, que interagem entre si, conferindo estabilidade e proteção ao material genético (SZOSTAK; BLACKBURN, 1982; LIU *et al.*, 2004; BLACKBURN, 2005; DE LANGE, 2005; STEWART; WEINBERG, 2006; CALADO; YOUNG, 2009).

Observou-se ainda que as células de mamíferos desenvolveram um mecanismo para “mascarar” as extremidades cromossômicas naturais por meio de uma modificação na conformação do DNA fita dupla e fita simples pelo que é conhecido como “T-loop” e “D-loop”, respectivamente, formando uma estrutura molecular em forma de “hairpin”, que esconde as pontas cromossômicas e impede a ativação indevida da maquinaria de reparo do DNA (GRIFFITH *et al.*, 1999; DE LANGE, 2005) (Figura 11).

Portanto, hoje sabemos que, em células humanas, os telômeros consistem de centenas de milhares de repetições em *tandem* TTAGGG na fita líder (CALADO; YOUNG, 2009). Os telômeros são responsáveis por proteger as extremidades dos cromossomos da degradação e do rearranjo e de serem reconhecidos como quebras de DNA (BLACKBURN, 2000; CALADO *et al.*, 2011).

Figura 11 - Estrutura dos telômeros

Fonte: Calado e Young (2009). Figura gentilmente cedida por Calado.

Na Figura 11 observa-se a organização específica dos telômeros nas extremidades de cromossomos lineares em forma de rearranjos T-loop e D-loop, que em conjunto com os telossomos (“shelterin”) auxiliam na proteção do DNA telomérico.

Quando as células dividem-se, os telômeros tornam-se mais curtos devido à inabilidade da DNA polimerase em replicar completamente a direção 3’ dos cromossomos. Este fenômeno também é conhecido como “problema da replicação final” ou marginotomia (OLOVNIKOV, 1971), que pode ser definido como a formação de novas cópias encurtadas de DNA em relação à molécula original (OLOVNIKOV, 1973).

Se os telômeros tornam-se expressivamente curtos, uma cascata de sinalização celular envolvendo proteínas como p53 e p21 pode ser ativada, resultando em incapacidade de proliferação, senescência e apoptose. Este processo explica a interrupção de proliferação em células humanas em cultura, o que também é

conhecido como “limite de Hayflick” (BLASCO, 2007; CALADO; YOUNG, 2009). Tal modelo foi proposto por Leonard Hayflick e Paul Moorhead em 1961 (HAYFLICK E MOORHEAD, 1961) para demonstrar que fibroblastos humanos em cultura podiam se dividir por um número limitado de vezes, que gira em torno de 50 a 60 vezes; após isto eles entram em senescência replicativa, perdem a capacidade de proliferação, podendo ou não chegar ao estágio de morte celular (HAYFLICK, 1985) (Figura 12).

Figura 12 - Relação entre o tamanho dos telômeros e a capacidade de proliferação celular.

Fonte: Adaptado da Revista Ciência Hoje, vol. 39, 2006.

Nesta Figura 12, mostra-se que as células germinativas (não diferenciadas – linha amarela) têm telômeros longos e multiplicam-se indeterminadamente, enquanto as células somáticas (já diferenciadas – linha laranja) dividem-se por 50 a 60 gerações e perdem seus telômeros gradualmente (o “limite de Hayflick” é o momento em que a maioria das células mostra sinais de envelhecimento). Células “em crise” sofrem apoptose ou adquirem mutações que permitem a imortalização, como as células cancerígenas. A linha roxa representa os pacientes portadores de telomeropatias.

A fim de evitar o atrito dos telômeros, células com alta capacidade proliferativa expressam telomerase, uma enzima transcriptase reversa, expressa em algumas células, capaz de sintetizar novas sequências de DNA e integrá-las às extremidades dos cromossomos, impedindo a redução do comprimento do telômero. Em humanos a telomerase é normalmente ativa em células germinativas jovens, células tronco

embrionárias e em algumas células somáticas, como as endoteliais, as células endometriais e os linfócitos T e B (FLORES; BENETTI; BLASCO, 2006; BLASCO, 2007).

A telomerase é um complexo proteico enzimático composto pela telomerase transcriptase reversa (TERT), um componente de RNA (TERC) usado como modelo para sintetizar sequências de DNA telomérico e as proteínas associadas como DKC1 que estabilizam o complexo (GREIDER; BLACKBURN, 1985; CALADO; YOUNG, 2009).

A ativação da telomerase é responsável por contornar a senescência celular ou a morte celular causada pelo encurtamento dos telômeros nas células. A estabilização dos telômeros pela reativação da telomerase é essencial para o crescimento e progressão tumoral, enquanto a falta de atividade dessa enzima leva à disfunção contínua dos telômeros, prejudicando a progressão das células neoplásicas pela indução da parada do ciclo celular e apoptose (SATYANARAYANA; MANNS; RUDOLPH, 2004). A expressão de TERT, que é necessária para a atividade da telomerase, é maior em vários tumores humanos quando comparada com a dos órgãos normais (DANIEL, M.; PEEK, G. W.; TOLLEFSBOL, 2012).

O encurtamento de telômeros devido às mutações nos genes da telomerase (como TERT, TERC – Componente de RNA do complexo da telomerase ou DKC1 - gene que codifica a proteína discerina) leva à disfunção orgânica, estando associado a algumas doenças humanas, as quais são conhecidas como “doenças dos telômeros” ou “telomeropatias”, incluindo a insuficiência da medula óssea, a disceratose congênita, a cirrose hepática e a fibrose pulmonar, bem como o risco aumentado de câncer (CALADO *et al.*, 2011).

Em pacientes com disceratose congênita, uma síndrome hereditária de falência da medula óssea, causada por mutações nos genes no complexo da telomerase, descreve-se a associação da fibrose pulmonar idiopática e de doenças hepáticas em cerca de 20% e 7% dos casos, respectivamente (DOKAL, 2000; ARMANIOS *et al.*, 2007; CALADO *et al.*, 2011), nos quais também se verifica uma significativa taxa de mutações na telomerase, 8-10% para a fibrose pulmonar idiopática e 3-6% para a cirrose hepática (ARMANIOS *et al.*, 2007; TSAKIRI *et al.*, 2007; CALADO *et al.*, 2011; HARTMANN *et al.*, 2011).

Hartmann *et al.* (2011) sequenciaram 1.121 indivíduos (521 pacientes com cirrose e 600 controles sem cirrose) e analisaram o comprimento dos telômeros em

pacientes portadores de mutações no gene telomerase. Nesse estudo foi detectada uma incidência aumentada de mutações da telomerase em pacientes cirróticos (frequência alélica (FA) = 0,017) em comparação com os controles (FA = 0,003, $p = 0,0007$; risco relativo [RR] = 1,859; intervalo de confiança de 95% [IC] 1,562-2,227). Além disso, os autores observaram que os pacientes com cirrose e mutações TERT tinham telômeros encurtados em células brancas do sangue periférico em comparação com os controles. Este estudo forneceu a primeira evidência experimental de que mutações no gene da telomerase estão presentes em pacientes em desenvolvimento de cirrose como uma consequência de doença hepática crônica. Estes dados apoiam o conceito de que o encurtamento dos telômeros pode representar um fator causal que prejudica a regeneração hepática e acelera a formação de cirrose em resposta à injúria hepática crônica.

De acordo com a hipótese do telômero na senescência celular, a superexpressão de TERT imortaliza uma variedade de células humanas primárias, incluindo hepatócitos. Camundongos com deficiência de telomerase apresentam defeitos na homeostase e envelhecimento prematuro de órgãos altamente proliferativos. Além disso, camundongos têm defeitos na regeneração do fígado e mostram formação acelerada de cirrose em resposta aos insultos hepáticos crônicos (KOLQUIST *et al.*, 1998; RUDOLPH *et al.*, 1999).

Recentemente, as mutações somáticas na região do promotor TERT (TERTp) foram detectadas em muitos tumores sólidos, e foi demonstrado que os polimorfismos podem influenciar no prognóstico da doença (KO *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2017; MOHAMADKHANI; POURASGARI; POUSTCHI, 2018). Por exemplo, Ko *et al.* (2016) mostraram que os portadores de câncer de fígado com o polimorfismo rs2853669 em conjunção com as mutações em TERTp tiveram pior prognóstico.

A lesão celular observada na hepatite C crônica ativa, persistentemente, o sistema de reparo tecidual e o ciclo celular dos hepatócitos. Portanto, a lesão hepática induz à regeneração hepatocitária, que se dá através da fibrogênese na tentativa de limitar a lesão sofrida. No entanto, quando a lesão é prolongada, esse estímulo constante aumenta o *turnover* celular, o que pode levar às alterações do comprimento do telômero e à consequente senescência e/ou apoptose celular.

Em virtude das questões anteriormente mencionadas, a escassez de estudos nessa área e as altas taxas de morbimortalidade da hepatite C crônica, procuramos caracterizar o comprimento dos telômeros em portadores de infecção crônica pelo

HCV, identificar possíveis mutações na região TERTp e avaliar a associação das mesmas à gravidade da doença hepática.

Hipótese

3 HIPÓTESE

O comprimento dos telômeros (CT) e variantes genéticas na região TERTp são marcadores para a gravidade da doença hepática secundária à infecção crônica pelo HCV?

Objetivos

4 OBJETIVOS

Em pacientes com hepatite C crônica:

4.1 Avaliar a relação entre o comprimento do telômero e o grau de fibrose hepática determinado pela histologia hepática.

4.2 Avaliar a associação entre as mutações na telomerase, o comprimento do telômero e a progressão da fibrose hepática.

4.3 Avaliar a relação entre o grau de esteatose hepática e o comprimento do telômero.

4.4 Avaliar a correlação entre o comprimento do telômero obtido no tecido hepático e em leucócitos de sangue periférico.

Pacientes e Métodos

5 PACIENTES E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética e pesquisa do HCFMRP USP sob o protocolo 866.068 / 2014.

5.1 Desenho do estudo

Na avaliação das características clínicas, laboratoriais e histológicas trata-se de um estudo, em parte, retrospectivo e transversal.

Na etapa de avaliação do comprimento do telômero e mutações genéticas apresenta características metodológicas de caso-controle.

5.2 Pacientes

Foram incluídos no estudo pacientes portadores de hepatite C crônica, genótipo 1, virgens de tratamento específico para o VHC, com idade igual ou superior a 18 anos e inferior ou igual a 70 anos, acompanhados nos Ambulatórios de Doenças do Fígado, Ambulatório de Hepatites e Ambulatórios de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP USP).

A infecção pelo HCV foi definida pela positividade de ambos marcadores: anti-HCV pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) e do ácido ribonucleico do vírus C (RNA HCV) pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). A infecção crônica pelo HCV foi definida pela positividade do RNA HCV por mais de 6 meses (BRASIL, 2016).

A determinação do genótipo do HCV foi realizada pela hibridização reversa, utilizando-se o DNA amplificado por PCR da região não traduzida 5' do genoma do HCV.

A coleta de dados foi realizada no período de 5 de março de 2015 a 31 de janeiro de 2016 e aconteceu nas seguintes fases:

- Identificação dos candidatos a participar do estudo a partir de um banco de dados da Divisão de Gastroenterologia de pacientes com hepatite C atendidos no HCFMRP USP.

- Levantamento dos prontuários médicos para coleta das informações clínicas e laboratoriais de cada paciente, além dos dados de biópsia hepática;
- Revisão de todas as biópsias hepáticas por um único patologista experiente em doenças do fígado, que desconhecia as informações clínicas e laboratoriais;
- Conferência e separação das amostras de ácido ribonucleico (DNA) extraídas a partir de sangue periférico já coletadas, e guardadas no Biorrepositorio criado para o presente estudo, armazenadas a – 20 graus Celsius (°C);
- Conferência e separação das amostras de tecido hepático obtidas a partir de biópsia hepática prévia, armazenadas a - 80 °C e guardadas no Biorrepositorio criado para o presente estudo.

5.3 Critérios de exclusão

- Não concordância em participar do estudo.
- Tratamento prévio para o vírus da hepatite C.
- Evidência de lesões hepáticas focais.
- Idade menor a 18 anos e superior a 70 anos.
- Coinfecção por vírus da hepatite B (VHB).
- Coinfecção por vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV).
- Infecção por vírus da hepatite C genótipo não 1.
- Existência de outras hepatopatias, como hepatite autoimune, deficiência de alfa-1 antitripsina, doença de Wilson, colangite biliar primária, colangite esclerosante primária e hepatite medicamentosa.
- Situações sabidamente associadas à sobrecarga de ferro: insuficiência renal crônica, hemoglobinopatias e porfiria cutânea tardia.
- Ingestão de etanol maior que 40g/dia para homens e 20g/dia para mulheres.

5.4 Seleção dos pacientes

5.4.1 Grupo de pacientes

Após revisão de 158 prontuários de pacientes portadores de hepatopatia crônica pelo HCV e aplicados os critérios de inclusão e exclusão do presente estudo,

oitenta e dois pacientes foram incluídos. Destes, cinquenta e dois tinham tecido hepático e DNA extraído de sangue periférico no Biorrepositorio.

Foram avaliadas as seguintes características clínicas:

- Idade, sexo e cor da pele: variáveis que constavam no prontuário médico do HCFMRP USP;
- Peso [quilogramas (Kg)] e altura [metros (m)]: variável obtida do prontuário médico no momento mais próximo da biópsia, podendo anteceder ou suceder a mesma em 6 meses;
- Comorbidades: investigada história médica de patologias e condições clínicas associadas (hemofilia, talassemia, anemia falciforme, coinfeção pelo HIV e/ou vírus da hepatite B (HBV), insuficiência renal crônica, porfiria cutânea tardia, crioglobulinemia e glomerulonefrite), que são critérios de exclusão já descritos no item 4.3;
- Ingestão alcoólica – quantidade [gramas (g/dia)] calculada pela seguinte fórmula: concentração de álcool na bebida (porcentagem - %) x volume ingerido (mililitros - mL) x 0,8 / 100. Considerada ingestão abusiva maior que 40g/dia para homens e 20g/dia para mulheres;
- IMC – índice de massa corpórea: peso (kg) / [altura (m²)].

Para a avaliação bioquímica, foram avaliados os seguintes dados laboratoriais, analisados no Laboratório Central do HCFMRP USP:

- enzimas hepáticas (Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA);
- função hepática: albumina, bilirrubinas total e frações, *internacional normalized ratio* (INR);
- glicemia de jejum;
- colesterol LDL (*Low Density Lipoproteins*) e triglicérides;
- cinética do ferro (ferritina e índice de saturação da transferrina).

Esses dados foram obtidos dos prontuários do HCFMRP USP. Todas as dosagens bioquímicas referem-se a um período de, no máximo, seis meses antes ou após a data da biópsia hepática.

5.4.2 Avaliação da histologia hepática

Variável obtida através da revisão das lâminas de biópsia hepática previamente realizadas. As biópsias hepáticas seguiram indicação baseada nos critérios estabelecidos no consenso nacional e internacional, utilizado na rotina da Clínica de Hepatites do HCFMRP-USP.

Todas as biópsias foram revisadas por um único patologista experiente, que desconhecia as informações clínicas e laboratoriais.

De acordo com a rotina previamente estabelecida pelo Serviço de Anatomia Patológica do HCFMRP-USP, a classificação de METAVIR foi utilizada para avaliar a fibrose hepática (BEDOSSA; POYNARD, 1996) (Figura 13). De acordo com o grau de fibrose os pacientes foram divididos em dois grupos: fibrose leve (METAVIR F1 e F2) e fibrose grave (METAVIR F3 e F4).

Figura 13 - Classificação de METAVIR para fibrose hepática

Fonte: Adaptado de *Hepatology*, v. 24 (1996).

Optamos por Knodell *et al.* (1981) para avaliação do grau de atividade necroinflamatória por considerarmos essa classificação mais minuciosa nesse quesito – IAH (índice de atividade inflamatória) - resultado 0 (sem inflamação); entre 1 e 4 (inflamação mínima); entre 5 e 8 (inflamação leve); entre 9 e 12 – (inflamação moderada) e entre 13 e 18 (inflamação acentuada).

A esteatose hepática foi avaliada, segundo Brunt *et al.* (1999), de acordo com a quantidade de hepatócitos acometidos: grau 0 (esteatose ausente), grau 1 (de 1 a 33%), grau 2 (de 33 a 66%) e grau 3 (superior a 66%).

Foi avaliada a presença de depósitos de ferro no fígado e os escores dos depósitos nas diferentes localizações, segundo Barton *et al.*, (1995) (Quadro 2).

Quadro 2 - Sistema de pontuação histológica dos depósitos de ferro em hepatócitos sinusóides e tratos portais

Depósitos de Ferro	Localização		
	Zona 1	Zona 2	Zona 3
Hepatócitos			
Sem ferro	0	0	0
Depósitos < 1/3 da zona	1	1	1
Depósitos 1/3 - 2/3 da zona	2	2	2
Depósitos > 2/3 da zona	3	3	3
Depósitos em toda zona	4	4	4
Sinusóides			
Sem ferro	0	0	0
Depósitos < 1/3 da zona	1	1	1
Depósitos 1/3 - 2/3 da zona	2	2	2
Depósitos > 2/3 da zona	3	3	3
Depósitos em toda zona	4	4	4
Tratos portais			
	Tecido Conectivo	Células Ducto biliar	Paredes Vasculares
Sem ferro	0	0	0
Depósitos < 1/3 da zona	1	1	1
Depósitos 1/3 - 2/3 da zona	2	2	2
Depósitos > 2/3 da zona	3	3	3
Depósitos em toda zona	4	4	4

(<): menor; (>): maior.

Fonte: Deugnier et al. (1993) modificado por Barton et al. (1995).

As biópsias hepáticas foram revistas por um único patologista experiente em doenças hepáticas, que desconhecia as informações clínicas e laboratoriais dos pacientes.

5.5 Grupo controle

Para comparação dos resultados do comprimento do telômero dos pacientes dessa casuística, foram analisadas amostras de sangue periférico de 181 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto / SP, com idade igual ou superior a 18 anos, com idade máxima de 70 anos, sem história de doenças

crônicas, infecciosas e / ou autoimunes e sorologias negativas (anti-HCV, HBsAg, anti-HBc IgG e anti-HIV). As amostras pertencem ao Banco de Amostras 007262/2013, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, sob a responsabilidade do Hemocentro de Ribeirão Preto / SP.

Os voluntários saudáveis incluídos na coleta foram pareados para idade e sexo em relação ao grupo de pacientes com hepatite C.

Para a análise das frequências mutacionais na população geral foram utilizados dados do Banco de Dados de Agregação do Genoma [gnomAD (LEK *et al.*, 2016)] e no Arquivo *Online* de Mutações Brasileiras (ABRAOM; NASLAVSKY *et al.*, 2017).

6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

6.1 Extração de DNA das amostras de biópsias hepáticas estocadas a -80°C e de leucócitos de sangue periférico

O material genético das amostras de tecido hepático e de leucócitos de sangue periférico foi extraído de acordo com o protocolo de “Blood and Tissue DNA Extraction” (Qiagen). A técnica consiste na utilização de colunas de separação para extração de DNA.

Inicialmente, o tecido hepático foi cortado com lâmina estéril em pequenos pedaços de 0,4-0,6 cm e colocados em microtubos de 1,5ml juntamente com 20µL de proteinase K. Realizada a mistura e a agitação com o vortex das amostras que foram incubadas a 56°C até a completa lise do tecido. Foi novamente realizado o vortex de cada amostra por 15 segundos.

Após o preparo descrito, as amostras foram processadas em lavagens subsequentes para a purificação do DNA. Primeiramente, foram adicionados 200 µL de etanol 100% em cada tubo. As soluções foram então pipetadas nas colunas de separação (fornecidas pelo kit) e centrifugadas a 8000 rotações por minuto (rpm) por 1 min, descartada a solução gerada. Foi novamente centrifugada a 8000 rpm por 1 min após acréscimo de 500µL do Buffer AW1 em novo microtubo de 2ml. Novamente descartada a solução e as amostras foram centrifugadas aposicionadas em novo microtubo de 2ml após adição de 500µL do Buffer AW2 por 3 min a 14000 rpm.

Procedeu-se então ao último descarte da solução gerada da lavagem e as colunas foram transferidas para microtubos estéreis de 2ml e eluidas com adição de 30µL do Buffer AE no centro da membrana de cada coluna preparada, incubadas por 2 min em temperatura ambiente (25°C) e centrifugadas por 2 min a 8000 rpm. As amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C até a próxima etapa da pesquisa.

6.2 Quantificação do DNA

Feita a quantificação das amostras pela técnica de Espectrofotometria *NanoVue* (GE *Healthcare Life Sciences*) (Figura 14). Todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), a fim de

confirmar a integridade do DNA para a realização do comprimento telomérico (Figura 15 e 16) e estocadas a -20°C em concentrações padrão de 50ng/mL para manuseio frequente. As soluções – mãe foram armazenadas para necessidade de reposição do material de trabalho.

Foi feita a comparação do valor final da quantificação de amostras aleatórias através da técnica Fluorometria Qubit (*Qubit Fluorometric Quantitation*) para averiguação do valor, tendo equivalência dos dados encontrados entre as técnicas. (Figura 17).

Figura 14 - Aparelho de Espectrofotometria *NanoVue* (GE Healthcare Life Sciences) – utilizado para quantificação de DNA das amostras

Figura 15 - Gel de agarose (1,5%) – processo de verificação da qualidade do DNA extraído

Figura 16 - Resultado da aplicação das amostras em Gel de agarose (1,5%) – bandas únicas e fortes

Figura 17 - Aparelho de Fluorometria Qubit (*Qubit Fluorometric Quantitation*) - utilizado para averiguação aleatória das quantificações de DNA prévias

6.3 Avaliação do comprimento do telômero em amostras de fígado e em leucócitos de sangue periférico

O comprimento telomérico das amostras de tecido hepático e de DNA de leucócitos do sangue periférico provenientes dos pacientes com HCV foram avaliados pela técnica baseada em PCR quantitativo (qPCR) com base em uma modificação do método descrito por Cawthon (2002) de acordo com protocolo do laboratório de

diluição seriada (1:2) com seis pontos, variando de 10ng (1° ponto) a 0,3125ng (6° ponto). As amostras que não se enquadrarem dentro desta curva foram desprezadas. Os resultados obtidos apenas são considerados se apresentarem reações com $R^2 \geq 0,99$, eficiência em torno de 100% e slope = $-3,3 \pm 10\%$.

O comprimento do telômero para cada amostra foi determinado usando a razão entre telômero e “single gene” (razão T/S) com o cálculo do ΔCt [$Ct(\text{telômero})/Ct(\text{single gene})$]. A razão T / S para cada amostra (x) foi normalizada para a relação média T / S da amostra de referência [$2 - (\Delta Ctx - \Delta Ctr) = 2 - \Delta \Delta Ct$], que também foi usada para a curva padrão, como amostra referência e como amostra de validação.

Em cada execução, duas amostras de referência foram incluídas para validar cada reação. O experimento foi considerado aceitável se a relação T / S da amostra de controle estivesse dentro do intervalo de variação de 95% (0,95 a 1,05).

A correlação entre as medidas de comprimento dos telômeros de uma coorte independente (n = 76) por qPCR e *Southern blot* foi usada para converter os valores da razão T / S em quilobases (kb). A equação de regressão linear utilizada foi: comprimento dos telômeros (kb) = $4,330x + 5,07$ ($R^2 = 0,55$; $p < 0,0001$), onde x corresponde ao valor da relação T / S (GUTIERREZ-RODRIGUES *et al.*, 2014).

Figura 18 - Pipetador automatizado QIAgility (Qiagen, Califórnia, EUA).

6.4 Sequenciamento genético para pesquisa das mutações na região promotora de TERT

Os tecidos hepáticos de pacientes com HCV foram rastreados para variantes genéticas na região do promotor TERT. O DNA total foi extraído de tecidos de 52 pacientes usando o protocolo de extração de DNA de sangue e tecido (Qiagen). As

Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram preparadas para cada amostra usando 100 ng de DNA, *primers forward* (5'-GAAGCGCGGCCAGACCC-3') e *reverse* (5'-CTGGCCACGTTTCGTGCGG-3') e o kit *HotStarTaq* DNA polimerase (Qiagen). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Reagente de Limpeza *ExoSAP-IT* (*Affymetrix*). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* e corridas no ABI 3500xL *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os cromatogramas foram analisados no *software Sequencher v5* (*GeneCode*). O teste do qui-quadrado foi aplicado para comparar as frequências de variantes na coorte de pacientes com HCV e as frequências em estudos genéticos populacionais fornecidos no Banco de Dados de Agregação do Genoma [*gnomAD*; (LEK *et al.*, 2016)]. O *software Prism* (*GraphPad*) foi utilizado para estatística e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise das variáveis demográficas e clínicas foi realizada por estatística descritiva (frequência, médias e desvios-padrão). A correlação entre o comprimento dos telômeros e o grau de fibrose hepática foi realizada por meio da análise de covariância (teste ANCOVA), teste t de *Student* pareado e pós-teste de *Tukey* para comparações múltiplas.

A fim de verificar a associação entre duas variáveis qualitativas, foi realizado o teste qui-quadrado. Para verificar os fatores de risco para o grau de fibrose, foi utilizado um modelo de regressão logística simples e múltiplo para estimar o *Odds Ratio* bruto e ajustado (HOSMER; LEMESHOW, 2000). A análise da relação das variáveis de interesse com o tamanho do telômero no sangue periférico e fígado foi feita através do modelo de regressão linear múltiplo. As comparações a partir deste modelo foram realizadas por contrastes ortogonais.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* SAS 9.2. Para todas as comparações adotou-se um nível de significância de 5%.

Para o desenvolvimento da pesquisa foi necessário analisar amostras de DNA, plasma, soro e biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica. O Departamento de Medicina Clínica - Divisão de Gastroenterologia do HCFMRP-USP (protocolo nº 3416/2003) tem um banco de dados de amostras biológicas (DNA, plasma, soro e biópsia hepática) que foi utilizado neste estudo.

Resultados

8 RESULTADOS

Foram avaliados 158 pacientes portadores de hepatite C crônica acompanhados nos Ambulatórios de Doenças do Fígado, Ambulatório de Hepatites e Ambulatórios de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP USP). Após aplicar os critérios de inclusão e exclusão do estudo e verificar a existência da guarda de plasma no nosso Biorrepositorio, restaram 82 pacientes. Destes, 52 pacientes tinham também tecido hepático estocado (Figura 19).

Foram ainda incluídas 181 amostras de indivíduos saudáveis no grupo controle para comparação da avaliação do comprimento do telômero (Figura 19).

Figura 19 - Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica incluídos no estudo de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos e com a possibilidade de avaliação de material biológico. Ribeirão Preto (São Paulo), 2015-2016

Legenda: HCV – hepatite C crônica; HBV hepatite B crônica; HIV – vírus da imunodeficiência humana adquirida; CHC – carcinoma hepatocelular; qPCR - PCR quantitativo; DNA: ácido desoxirribonucleico.

Fonte: Autoria própria (2018).

8.1 Características gerais dos pacientes

O grupo de pacientes com HCV foi composto por 82,9% de indivíduos do sexo masculino (n = 68, e 17,1% do sexo feminino (n=14). De acordo com a cor da pele, foram assim distribuídos: 63/82 (76,8%) brancos; 11/82 (13,4%) mulatos; 7/82 (8,5%) negros e 1/82 (1,4%) amarelos (Tabela 1).

A média de idade do grupo de portadores de HCV e do grupo controle $\pm$ desvio padrão (DP) foi de 49,2 anos ($\pm$ 10,8) e 36,4 ($\pm$ 13,7) anos, respectivamente. Dos pacientes do grupo HCV, 80,5% tinham mais de 40 anos (n = 66).

Foi possível avaliação do IMC em 66/82 dos pacientes portadores de HCV (80%), uma vez que havia falha de registro dos demais. A média do IMC foi de $26 \pm 4,11$ kg/m², sendo o menor valor de 19,4 kg/m² e maior valor de 40 kg/m². A distribuição foi equivalente do IMC entre os grupos de fibrose leve e grave, tendo como média $\pm$ DP $25,49 \pm 3,79$ kg/m² e $27 \pm 4,65$ kg/m², respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)

Variáveis clínicas	Número de pacientes (n = 82)	Média $\pm$ DP	Percentual
Sexo (n = 82/82)			
Feminino	14	49,2 anos ($\pm$ 10,8)	17,1%
Masculino	68		82,9%
Idade (n = 82/82)			
$\leq$ 40 anos	16	49,2 anos ($\pm$ 10,8)	19,5%
$>$ 40 anos	66		80,5%
Cor da pele (n = 82/82)			
Branca	63	26 $\pm$ 4,11 kg/m ²	76,8%
Mulata	11		13,4%
Negra	7		8,5%
Amarela	1		1,4%
IMC (n = 66/82)			

Legenda: DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corpórea; n: número; $>$ maior; $\leq$: menor ou igual.

8.2 Características laboratoriais dos pacientes

Em relação ao genótipo, foram incluídos apenas pacientes com genótipo 1, que foram distribuídos em relação aos subtipos em 37/82 (45,1%) subtipo 1a, 32/82 (39%) subtipo 1b, 8/82 (9,8%) subtipo 1a/1b e 5/82 (6,1%) subtipo 1.

Em relação a avaliação das enzimas hepáticas, foram avaliados 80/82 pacientes e divididos em dois grupos: enzima I – aminotransferases (AST e ALT), e enzima II – canaliculares (GGT e FA). Os pacientes foram ainda divididos em subgrupos, a depender do grau de alteração em relação ao limite superior da normalidade (xLSN) - (I até 2x LSN; II até 4x LSN e III > 4x LSN).

Em relação a avaliação de INR, albumina e bilirrubinas, os pacientes foram agrupados em dois blocos distintos: aqueles com função hepática normal e os com função hepática anormal. Nos casos de alteração de apenas um dos exames em relação aos valores de referência do HCFMRP USP, o paciente foi classificado no grupo de função hepática anormal. Observamos que da amostra, 95,1% (77/82) apresentavam função hepática normal (Tabela 2).

As enzimas hepatocelulares foram normais em apenas 27,5% (22/80). A maioria dos pacientes (52/80 – 55%) apresentava leve alteração de AST e ALT (2x – 4x LSN) (Tabela 2).

As enzimas canaliculares foram normais em 37,5% dos pacientes (30/80). Observamos que 52,5% deles apresentavam valores alterados em até 4x do LSN (42/80 dos pacientes) (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados referentes a avaliação das alterações enzimáticas e da função hepática dos pacientes com hepatite C crônica. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).

Função hepática	Nº de pacientes	Percentual
Normal	77	95,1%
Anormal	4	4,9%
Frequência de <i>Missing</i> = 1		
Enzimas Hepatocelulares		
Sem alterações	22	27,5%
Alteração < 2x o LSN	40	50,0%
Alteração ≥ 2x e ≤ 4x o LSN	12	15,0%
Alteração > 4x o LSN	6	7,5%
Frequência de <i>Missing</i> = 2		
Enzimas canaliculares		
Sem alterações	30	37,5%
Alteração ≥ 2x e ≤ 4x o LSN	42	52,5%
Alteração > 4x o LSN	8	10,0%
Frequência de <i>Missing</i> = 2		

Legenda: LSN: limite superior da normalidade; Nº: número; <: menor; >: maior; ≤: menor ou igual; ≥: maior ou igual.

A dosagem de LDL foi avaliada em 69/82 dos pacientes, tendo média de 100 ±

27,48 mg/dL, mediana 97 mg/dL (variação de 37 a 97 mg/dL).

Os valores de triglicerídeos foram avaliados em 71/82 dessas pessoas, tendo média de $112 \pm 58,94$ mg/dL, mediana 97 mg/dL (variação de 26 a 286 mg/dL).

Os valores de glicemia foram avaliados em 72/82 dos pacientes, tendo média de 102 ± 50 mg/dL, mediana 93 mg/dL (variação de 75 a 498 mg/dL).

Em relação a avaliação da cinética do ferro, a ferritina sérica foi avaliada em 100% dos pacientes, com valores absolutos que variaram entre 23,2 a 1939 ng/mL, com média $\pm$ DP de $471,65 \pm 394,46$ ng/mL e mediana de 386 ng/mL. A saturação de transferrina foi avaliada em 79/82 deles, tendo como média $\pm$ DP de $43\% \pm 17\%$ e mediana de 40% (variação 6 a 93%).

8.3 Variáveis clínicas/ laboratoriais e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs) e em tecido hepático (CTf)

Na análise de regressão linear simples observou-se que não houve relação estatisticamente significativa entre o comprimento do telômero medido no sangue periférico (CTs) e o sexo dos pacientes com HCV [IC (95%): -0,19 - 0,11; $p=0,56$]. (Figura 20 e Tabela 3).

Figura 20 - Correlação entre variável “Sexo” e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).

Na análise de regressão linear simples observou-se que não houve relação

estatisticamente significativa entre o comprimento do telômero medido no tecido hepático (CTf) e o sexo dos pacientes com HCV [IC (95%): -0,24 - 0,36; $p=0,69$]. (Figura 21 e Tabela 6).

Figura 21 - Correlação entre variável “Sexo” e o comprimento do telômero medido no tecido hepático (CTf) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).

Em relação à idade foi observado, também, que não houve variação do comprimento do telômero medido em sangue e fígado com essa variável ($p=0,66$ e $p=0,49$, respectivamente) (Figuras 22 e 23; Tabelas 5 e 6).

Figura 22 - Correlação entre variável “Faixa etária” e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82).

Figura 23 - Correlação entre variável “Faixa etária” e o comprimento do telômero medido no tecido hepático (CTf) dos pacientes com HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).

Na análise de regressão linear simples foram observados CTs menores em pacientes brancos ($p=0,05$). No entanto, na regressão multivariada, essa associação não se repetiu ($p=0,70$) (Tabela 3).

Não houve associação entre a cor de pele e o comprimento do telômero em tecido hepático (Tabela 4).

Tabela 3 - Análise de regressão linear simples e ajustada das variáveis clínicas e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)

Variáveis	Regressão linear simples			Regressão linear ajustada		
	Estimativa bruta	IC 95%		Estimativa ajustada	IC 95%	
Sexo						
Feminino	-0,04	-0,19	0,11	-0,07	-0,34	0,21
Masculino	ref			ref		
Idade						
≤40	0,04	-0,16	0,25	-0,12	-0,41	0,17
>40	ref			ref		
Cor da pele						
Amarela	-0,58	-1,07	-0,09	-0,34	-1,05	0,37
Branca	-0,17	-0,38	0,04	-0,10	-0,38	0,17
Mulata	-0,05	-0,30	0,21	-0,02	-0,40	0,35
Negra	ref			ref		

Tabela 4 - Análise de regressão linear simples e ajustada das variáveis clínicas dos pacientes portadores de HCV e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf).
Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52)

Variáveis	Regressão linear simples			Regressão linear ajustada				
	Estimativa bruta	IC 95%		Valor p	Estimativa ajustada	IC 95%		Valor p
Sexo				0,69				0,10
Feminino	0,06	-0,24	0,36		0,60	-0,15	1,35	
Masculino	ref				Ref			
Idade				0,49				0,70
≤ 40	-0,14	-0,55	0,27		-0,17	-1,13	0,79	
> 40	ref				Ref			
Cor da pele				0,23				0,24
Amarela	-0,01	-0,88	0,86		-0,90	-2,66	0,85	
Branca	0,41	-0,04	0,87		0,40	-0,27	1,07	
Mulata	0,43	-0,12	0,98		0,44	-0,55	1,44	
Negra	ref				Ref			

Os comprimentos de telômero medidos em sangue periférico e em tecido hepático não variaram de acordo com as alterações laboratoriais [ferritina, índice de saturação de transferrina – IST, glicemia, LDL, função hepática e enzimas hepáticas – hepatocelulares (AST e ALT) e canaliculares (GGT e FA)] dos pacientes portadores de HCV, conforme demonstrado nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Análise de regressão linear simples e ajustada das características laboratoriais dos pacientes portadores de HCV e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)

Variáveis	Regressão linear simples				Regressão linear ajustada			
	Estimativa bruta	IC 95%		p*	Estimativa ajustada	IC 95%		p*
Ferritina	-0,00001	0,00017	0,00014	0,86	0,00005	0,00027	0,00038	0,74
IST	-0,002	-0,005	0,001	0,22	-0,00375	0,00911	0,00161	0,16
Glicemia	0,00001	0,00112	0,00114	0,99	0,000	-0,002	0,002	0,70
LDL	-0,0009	-0,0030	0,0013	0,43	0,00	0,00	0,00	0,91
Triglicerídeos	0,0003	-0,0007	0,0013	0,50	0,00056	0,00081	0,00194	0,41
Função hepática				0,29				0,67
Normal	-0,18	-0,51	0,15		-0,12	-0,69	0,45	
Anormal	ref				ref			
Enzimas AST/ALT				0,05				0,38
Normal	0,09	-0,14	0,32		-0,06	-0,39	0,28	
≤ 2x LSN	0,02	-0,19	0,24		-0,14	-0,46	0,18	
> 2x e ≤ 4x LSN	0,24	0,00	0,48		0,07	-0,30	0,44	
III > 4x LSN	ref				ref			
Enzimas GGT/FA				0,60				0,60
Normal	0,10	-0,11	0,30		0,15	-0,16	0,46	
≤ 4x LSN	0,05	-0,14	0,25		0,10	-0,19	0,39	
II > 4x LSN	ref				ref			

Legenda: IST: índice de saturação de transferrina; LDL: Low Density Lipoprotein; LSN: limite superior da normalidade; FA: fosfatase alcalina; GGT: gamaglutamiltransferase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; ≤: menor ou igual; >: maior; <: menor.

Tabela 6 - Análise de regressão linear simples e ajustada das características laboratoriais dos pacientes portadores de HCV e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf). Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52)

Variáveis	Regressão linear simples				Regressão linear ajustada			
	Estimativa bruta	IC 95%		p*	Estimativa ajustada	IC 95%		p*
Ferritina	0,00016	-0,00013	0,00045	0,27	0,00043	-0,00049	0,00135	0,32
IST	0,00012	-0,007	0,007	0,97	-0,00361	-0,02251	0,01528	0,68
Glicemia	0,00099	-0,00089	0,00288	0,29	0,002	-0,003	0,007	0,48
LDL	0,0012	-0,0046	0,0071	0,67	0,00	-0,01	0,02	0,48
TRIGL	0,0011	-0,0008	0,0030	0,25	0,00267	-0,00223	0,00757	0,25
AST/ALT				0,10				0,89
Normal	-0,52	-0,95	-0,09		-0,32	-1,27	0,64	
≤ 2x LSN	-0,45	-0,86	-0,05		-0,26	-1,11	0,59	
> 2x e ≤ 4x LSN	-0,51	-0,98	-0,04		-0,31	-1,48	0,86	
III > 4x LSN	ref				ref			
GGT/FA				0,44				0,58
Normal	-0,27	-0,69	0,15		-0,52	-1,69	0,65	
≤ 4x LSN	-0,19	-0,57	0,19		-0,28	-1,26	0,69	
II > 4x LSN	ref				ref			

Legenda: IST: índice de saturação de transferrina; LDL: Low Density Lipoprotein; LSN: limite superior da normalidade; FA: fosfatase alcalina; GGT: gamaglutamiltransferase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; ≤: menor ou igual; >: maior; <: menor.

8.4 Achados histológicos

8.4.1 Achados histológicos e comprimento do telômero em sangue periférico (CTs).

Foram identificados 71% (58/82) dos pacientes com fibrose leve (F1 / F2) e 29% (24/82) com fibrose grave (F3 / F4). Não houve relação entre o grau de fibrose hepática e o CTs na coorte estudada (p=0,91) (Tabela 7).

Segundo a classificação de Knodell *et al* (1981) – IAH – a distribuição foi: 6,1% (5/82 dos pacientes) com inflamação mínima; 36,6% (30/82) com inflamação leve; 43,9% (36/82) com inflamação moderada e 13,4% (11/82 dos pacientes) com inflamação acentuada (Tabela 7).

Cerca de 77% daqueles com HCV apresentaram nenhuma ou leve deposição de gordura nos hepatócitos (< 33% dos hepatócitos acometidos, conforme Brunt *et al*. (1999). Não houve relação entre o grau de esteatose e o CTs na coorte estudada [IC

(95%): -0,13 - 0,45; $p=0,63$] (Tabela 7).

Em relação ao depósito de ferro, conforme a classificação de Barton *et al.* (1995), observamos que 86,6% e 74,4% não possuem depósitos em tratos portais e em sinusóides, respectivamente; 51,2% dos pacientes (42/82) possuem depósitos de ferro em hepatócitos, em $< 1/3$ da zona, distribuídos de maneira semelhante nas diferentes zonas. Não houve relação estatisticamente significativa entre o depósito de ferro nos hepatócitos e o CTs [IC (95%): -0,27 - 0,19; $p=0,60$].

Foi avaliada a relação entre o grau de atividade inflamatória por Knodell – IAH e CTs. Observamos que essa variável não foi fator independente para alteração de CTs [IC (95%): -0,52 - 0,23; $p=0,76$] (Tabela 7).

Tabela 7 - Características histológicas dos pacientes com HCV e a análise de correlação estatística com o comprimento do telômero em sangue periférico (CTs).
Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)

Grau de Esteatose*	Nº de pacientes	Percentual	p*
0	33	40.2%	0,63
1	30	36.6%	
2	14	17.1%	
3	5	6.1%	
Severidade da Inflamação – AIH**			0,76
Ausência de inflamação	0	0%	
Inflamação mínima	5	6,1%	
Inflamação leve	30	36,6%	
Inflamação moderada	36	43,9%	
Inflamação acentuada	11	13,4%	
Severidade da fibrose – METAVIR			0,91
Grave – F3 e F4	24	29.3%	
Leve – F1 e F2	58	70.7%	

*Brunt *et al.* (1999)

** Knodell *et al.* (1981)

O CT médio medido no sangue periférico foi de $0,8 \pm 0,3$ em indivíduos saudáveis, $0,7 \pm 0,2$ em pacientes com HCV com fibrose leve (F1 / F2) e $0,7 \pm 0,2$ naqueles com fibrose grave F3 / F4. Não foi observada associação entre o CTs de pacientes com HCV e a gravidade da doença hepática ($p = 0,91$) (Tabela 8 e Figura 24).

Tabela 8 - Razão T / S no sangue periférico e gravidade da doença hepática em portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=82)

T/S sangue periférico							
Fibrose	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
Controle	181	0,81	0,26	0,26	0,80	1,46	0.91
Grave (F3, F4)	24	0,71	0,24	0,31	0,63	1,19	
Leve (F1, F2)	58	0,72	0,23	0,35	0,68	1,45	

*Valor p referente da ANCOVA ajustada pela idade

Figura 24 - Distribuição do comprimento dos telômeros emparelhados por idade no sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=181) e de pacientes com HCV (n=82). Ribeirão Preto (São Paulo)

Na Figura 24 identificamos que a análise de TL (Telomere Length) não revelou diferenças estatísticas entre pacientes com HCV e indivíduos saudáveis analisados por qPCR ($p > 0,05$). Nenhuma diferença estatística relacionada à gravidade da fibrose foi observada naqueles com HCV ($p > 0,05$).

8.4.2 Achados histológicos e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf).

O comprimento do telômero em tecido hepático (CTf) foi analisado em 52 pacientes que tinham amostra já analisada de sangue periférico e que também tinham DNA extraído do tecido em qualidade suficiente para a aferição do comprimento do telômero pela técnica de qPCR. As características histológicas desse subgrupo (n = 52) foram semelhantes ao grupo inicial do estudo (n = 82).

Observou-se que 70% (36/52) dos pacientes apresentavam fibrose leve (F1 /

F2) e 30% (16/52) fibrose grave (F3 / F4), de acordo com a classificação de METAVIR. Não houve relação entre o grau de fibrose hepática e o CTf na coorte estudada ($p=0,94$) (Tabelas 9 e 10).

Avaliou-se o grau de atividade inflamatória no grupo HCV segundo a classificação de Knodell *et al.* (1981) – IAH. A distribuição foi: 5% com inflamação mínima; 19% com inflamação leve; 63% com inflamação moderada e 13% com inflamação acentuada. Foi avaliada a relação entre o grau de atividade inflamatória e o CTf e observou-se que essa variável não foi fator independente para alteração de CTf ($p=0,56$) (Tabela 9).

Cerca de 77% dos pacientes com HCV apresentaram nenhuma ou leve deposição de gordura nos hepatócitos ($< 33\%$ dos hepatócitos acometidos, conforme Brunt *et al.* (1999)). Não foi evidenciada associação entre o grau de esteatose e o CTf na coorte estudada ($p=0,49$) (Tabela 9).

Em relação ao depósito de ferro, conforme a classificação de Barton *et al.* (1995), observou-se que 86% e 68% não possuíam depósitos em tratos portais e em sinusóides, respectivamente. Depósitos de ferro em hepatócitos foram observados em 63% da casuística, em $< 1/3$ da zona, distribuídos de maneira semelhante nas diferentes zonas. Não houve relação estatisticamente significativa entre depósito de ferro nos hepatócitos e o CTf ($p=0,60$).

O CT foi mais longo nos tecidos hepáticos dos pacientes em comparação com o sangue periférico de ambos, controles e pacientes com HCV ($p < 0,01$). CT de tecidos hepáticos foi de $1,3 \pm 0,5$ em pacientes com fibrose leve (F1 / F2) e $1,2 \pm 0,3$ naqueles com fibrose grave (F3 / F4) (Tabela 10 e Figura 25). Não houve diferença estatisticamente significativa do CT entre doentes com fibrose leve e grave ($p = 0,9$) (Tabela 11).

Quando se avaliou como desfecho final a gravidade de fibrose hepática, foi observado maior risco de fibrose mais grave em pacientes com maior comprimento telomérico, tanto na análise de CTs quanto de CTf (OR: 1,29 e OR: 3,26, respectivamente). No entanto, essa associação vista não teve significância estatística ($p= 0,59$ e $p= 0,86$, respectivamente) (Tabela 14).

Tabela 9 - Características histológicas dos pacientes com HCV e a análise de correlação estatística com o comprimento do telômero em tecido hepático (CTf).
Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).

Grau de Esteatose *	Nº de pacientes	Percentual	p*
0	15	39.5%	0,49
1	14	36.8%	
2	7	18.5%	
3	2	5,2%	
Severidade da Inflamação - AIH **			0,56
Ausência de inflamação	0	0%	
Inflamação mínima	2	5.2%	
Inflamação leve	7	18.5%	
Inflamação moderada	24	63,2%	
Inflamação acentuada	5	13,1%	
Severidade da fibrose – METAVIR			0,94
Grave – F3 e F4	16	30%	
Leve – F1 e F2	36	70%	

*Brunt *et al.* (1999)
** Knodell *et al.* (1981)

Tabela 10 - Razão T / S no tecido hepático e gravidade da doença hepática em portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).

T/S fígado							
Fibrose	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p*
Controle	181	0,81	0,26	0,26	0,80	1,46	<0,01
Grave (F3, F4)	16	1,20	0,28	0,74	1,15	1,79	
Leve (F1, F2)	36	1,28	0,49	0,50	1,21	2,98	

*Valor p referente da ANCOVA ajustada pela idade

Tabela 11 - Pós teste de Turkey para análise da CTf (razão T / S) e a gravidade da doença hepática em portadores de HCV. Ribeirão Preto (São Paulo), (n=52).

Pós teste de Tukey

Comparações	Diferença estimada	IC 95%		Valor p
Grave - Controle	0,53	0,34	0,72	<0,01
Leve – Controle	0,56	0,43	0,69	<0,01
Leve – Grave	0,03	-0,18	0,24	0,94

Figura 25 - Distribuição do comprimento dos telômeros emparelhados em idade no sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=181) e tecidos do fígado de pacientes com HCV (n=52). Ribeirão Preto (São Paulo).

Constatamos que a análise de TL em tecido hepático revelou diferenças estatísticas entre pacientes com hepatite HCV e indivíduos saudáveis analisados por qPCR ($p < 0,01$).

8.4.3 Análise das variáveis clínicas e laboratoriais tendo como desfecho final grau de fibrose hepática

Foi avaliada ainda a influência das variáveis clínicas e bioquímicas na gravidade da fibrose hepática. Observou-se na análise univariada que maior grau de atividade inflamatória, maior deposição de ferro no parênquima e maior elevação das enzimas canaliculares estão diretamente relacionados com maior gravidade da fibrose hepática ($p < 0,01$, $p = 0,03$ e $p = 0,01$, respectivamente) (Tabela 12).

Após análise multivariada, ajustando o comprimento do telômero (CTs e CTf), evidenciou-se que o intenso grau de inflamação do parênquima hepático (inflamação moderada – IAH entre 9 e 12, KNOELL *et al.*, 1981) aumenta a chance de maior gravidade da fibrose hepática [IC: 2,11 – 489,36, ($p < 0,01$)] (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise de regressão logística bruta e ajustada por T/S no fígado e em sangue periférico.

Efeitos	Regressão logística bruta				Regressão logística ajustada por T/S fígado				Regressão logística ajustada por T/S SP			
	OR	IC 95% OR		p*	OR	IC 95% OR		p*	OR	IC 95% OR		p*
CTf	0,64	0,15	2,76	0,55	1,29	0,08	19,99	0,86	-	-	-	-
CTs	0,77	0,05	12,42	0,86	-	-	-	-	3,26	0,04	240,71	0,59
Sexo (Masculino vs Feminino)	1,05	0,23	4,70	0,95	0,08	0,00	1,76	0,11	0,06	0,00	1,66	0,10
Idade - anos (>40 vs ≤40)	2,33	0,44	12,30	0,32	1,54	0,07	32,37	0,78	1,96	0,09	41,96	0,67
Cor da pele (Mulata/Negra vs Amarela/Branca)	0,96	0,21	4,30	0,95	0,80	0,04	14,85	0,88	0,74	0,04	14,43	0,84
Knodell - IAH (V vs II/III/IV)	27,22	2,96	250,55	<0,01	32,10	2,11	489,36	0,01	32,41	2,39	439,73	<0,01
Brunt et al. (2/3 vs 0)	3,80	0,85	17,04	0,08	2,33	0,15	36,72	0,55	2,16	0,15	32,06	0,58

Legenda: CTf: comprimento do telômero em fígado; CTs: comprimento do telômero em sangue periférico; SP: sangue periférico; IAH: índice de atividade necroinflamatória; >: maior; ≤: menor ou igual; vs: versus.

8.4.4 Sequenciamento genético e comprimento do telômero em tecido hepático (CTf)

A região promotora de TERT (TERTp) de tecidos hepáticos de 52 pacientes foi rastreada por sequenciamento de Sanger. Nenhuma das variantes patogênicas previamente descritas no câncer, como C228T e C250T, foi detectada nesses indivíduos. Um SNP (Single Nucleotide Polymorphism), rs2853669, foi identificado nessa coorte em 21 (40%) pacientes com fibrose leve (F1 / F2) e em 8 (15%) com fibrose grave (F3 / F4). Como essa variante é um SNP, usamos dados de estudos genéticos populacionais para comparar as frequências entre os pacientes e a população.

As frequências foram obtidas de um consórcio internacional (gnomAD), representado por 15.323 indivíduos e de um banco de dados brasileiro (ABraOM), composto por exomas de 609 indivíduos, o que é geneticamente mais próximo de nossa coorte de pacientes.

A frequência alélica relatada do SNP rs2853669 foi de 24% no gnomAD e 29% no ABraOM. A frequência alélica do SNP foi encontrada enriquecida nos pacientes com fibrose leve quando comparados ao gnomAD ou ABraOM ($p = 0,04$ e $0,001$,

respectivamente), a única condição em que foi observada diferença estatística para os dois bancos de dados (Tabela 13).

O sequenciamento dos éxons 3,4,5,6,7,8,9,12,13,14 e 15 de *TERT* em 96 amostras de sangue periférico de portadores de HCV não detectou mutações.

Tabela 13 - SNP (Single Nucleotide Polymorphism) na região TERTp (rs2853669) nos pacientes com HCV e na população (grupo controle)

	Genótipos			Frequência Alelo	p ***	
	G/G	A/G	A/A	G	gnomAD	ABraOM
HCV pacientes (n=52)	6	23	23	0,34	0,07	0,0001
F1/F2 (n=35)*	5	16	14	0,37	0,04	0,0001
F3/F4 (n=17)*	1	7	9	0,26	0,85	0,006
gnomAD** (n=15.323)	1.006	5.327	8.990	0,24	NA	
ABraOM (n=609)	94	61	277		NA	

* Pacientes estratificados em grau de fibrose hepática;

** gnomAD representa a soma das contagens de alelos para todas as etnias disponíveis;

*** Teste do qui-quadrado; valor p em comparação a gnomAD ou ABraOM.

Discussão

9 DISCUSSÃO

O curso natural da infecção crônica pelo HCV é heterogêneo, incluindo diferentes graus de fibrose, cirrose e suas complicações, como o carcinoma hepatocelular (CHC) (DAVIS *et al.*, 2003). Dependendo dos fatores de risco, alguns pacientes evoluem rapidamente para cirrose e o CHC, enquanto outros têm um curso benigno da doença. A história natural dessa enfermidade permanece incompletamente definida.

Nas últimas décadas, vários conhecimentos foram adquiridos em relação a importância de fatores imunes, genéticos e epigenéticos na evolução das afecções crônicas, incluindo a cirrose hepática.

No presente estudo foram avaliados pacientes portadores de hepatite C crônica e suas características clínicas, laboratoriais, histológicas e genéticas, como análise do comprimento do telômero medido em sangue periférico e tecido hepático, além do sequenciamento da região promotora de TERT; também avaliamos a influência das mesmas na gravidade de lesão hepática.

O estudo incluiu 82 pacientes com hepatite C crônica, genótipo 1, com predomínio do sexo masculino (82,9%). Dados semelhantes foram encontrados em vários outros estudos realizados na mesma área (MARTINELLI; RAMALHO; ZUCOLOTO, 2004; SOUSA, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2010). Poynard *et al.* (2003) em uma avaliação de 1.379 casos de HCV, identificaram 60% de homens na casuística. Dados recentes do Ministério da Saúde estão de acordo com nossos dados, pois desde 1999, entre os 200.839 casos confirmados de hepatite C, 116.512 (58,0%) ocorreram em indivíduos do sexo masculino e 84.245 (42,0%) nos do sexo feminino. Apesar de o número de casos entre homens ser superior, observou-se ligeira diminuição da razão de sexos ao longo dos anos analisados – em 2007, a razão de sexos foi de 1,5, passando para 1,3 no ano de 2017 (BRASIL, 2018).

Acredita-se que o predomínio do sexo masculino em portadores de HCV possa estar relacionado ao compartilhamento de materiais perfurocortantes para uso de drogas ilícitas, prática mais comum entre homens, sendo esta via um dos principais fatores de risco para a transmissão do vírus.

Optamos por incluir apenas pacientes com o genótipo 1 com o objetivo de homogeneizar a amostra e minimizar possíveis interferências nos resultados relacionados, intrinsecamente, ao genótipo. O genótipo 1 é o mais prevalente no

Brasil, responsável por aproximadamente 70% dos casos, seguido sucessivamente pelo genótipo 3, 2 e 4, em 27%, 4% e 0,4% dos pacientes (MESSINA *et al.*, 2015).

Observamos que 80% dos pacientes incluídos no estudo tinham mais de 40 anos na época da biópsia hepática, média de idade de 49 anos, em concordância com dados previamente publicados (POYNARD *et al.*, 2003; SOUSA, 2011). De acordo com o Boletim das Hepatites Virais – 2018, desde 1999, observa-se que os casos notificados de hepatite C ocorreram, em sua maioria, em pessoas com mais de 40 anos. Esses dados corroboram com o fato de que a grande maioria dos pacientes tem mais de 40 anos na época do diagnóstico. A aquisição do HCV provavelmente ocorreu enquanto adultos jovens, período de maior exposição aos fatores de risco, corroborando com a história natural da doença, a qual tem caracteristicamente curso silencioso e lento, com 20 a 30 anos de evolução (BRASIL, 2018).

As enzimas hepatocelulares estavam elevadas em 75% dos pacientes, principalmente com discretas alterações ($< 1x$ LSN), dados semelhantes ao encontrado por Silva *et al.* (2006) que, avaliando a sobrecarga de ferro em 98 pacientes com HCV, encontraram valores de AST elevados em 66,7% de sua casuística. Sousa (2011) também observou transaminases elevadas em cerca de 70% dos pacientes em uma coorte de 256 indivíduos com HCV.

Em 56% dos pacientes estudados, a ferritina sérica estava acima de $1,0x$ LSN (valor de referência: homens até 359ng/mL; mulheres até 159ng/mL). Hiperferritinemia em pacientes com hepatite C crônica também foi encontrada por Kazemi-Shirazi *et al.* (1999) e Sousa (2011). Saturação de transferrina maior ou igual a 42% foi encontrada em 40% dos indivíduos, dado evidenciado por estudos anteriores (KAZEMI-SHIRAZI *et al.*, 1999; CARNEIRO *et al.*, 2010; SOUSA, 2011).

A ferritina tem sido empregada como marcador de depósito de ferro no fígado por ser uma ferramenta não invasiva. Na hepatite C crônica, a hiperferritinemia geralmente está associada à atividade necroinflamatória e com depósitos de ferro nas células mesenquimais. No entanto, é importante ressaltar que a ferritina é uma proteína de fase aguda e pode estar elevada em outras situações, como infecções e em contextos de síndrome metabólica e doença hepática gordurosa, o que é comum em portadores de hepatite C crônica (KELL; PRETORIUS, 2014; ZOU; SUN, 2017).

Foram encontrados depósitos de ferro em 61% dos indivíduos, principalmente em hepatócitos e na Zona 1 de Rappaport; em 51% desses, a deposição foi apenas

em menos de 1/3 da zona (grau I). Houve também deposição de ferro em sinusóides (25%) e em tratos portais (13%) dos portadores de hepatite C.

Di Bisceglie *et al.* (1992) foram os primeiros a encontrar níveis elevados de ferritina sérica e ferro em pacientes com hepatite crônica secundária a HCV e HBV. Posteriormente, em 1999, um estudo de 209 pacientes com HCV apontou acúmulo de ferro em biópsia hepática em 42,1% deles, a maioria dos quais com leve deposição de ferro hepático (35,4% dos 209 pacientes com HCV). Muitos estudos desde então descrevem a deposição de ferro nos hepatócitos e células reticulo endoteliais em pacientes com hepatite crônica, sendo hoje amplamente aceito que o HCV está associado com a sobrecarga de ferro (OLYNYK *et al.*, 1995; HÉZODE *et al.*, 1999; PRICE; KOWDLEY, 2009; HÖRL; SCHMIDT, 2013), corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

Não estão esclarecidos os mecanismos para a deposição do ferro no parênquima e sua relação com a progressão da fibrose hepática ainda é controversa. Sugere-se que o ferro seja liberado pelos hepatócitos necróticos, devido à lise celular imuno-mediada e citopática. Aventa-se, ainda, a possibilidade de excesso de absorção intestinal, participação dos polimorfismos no gene HFE ou participação de outros fatores genéticos (HÉZODE *et al.*, 1999; METWALLY; ZEIN; ZEIN, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2010).

Os padrões histológicos de deposição de ferro no fígado podem fornecer informações importantes relacionadas ao mecanismo da lesão hepática (PIETRANGELO, 2003). Classicamente na hemocromatose hereditária, o acúmulo é preferencialmente hepatocelular periportal (Zona 1 de Rappaport), com diminuição dos gradientes nas zonas 2 e 3. Visto ainda deposição em células de Kupffer, sinusóides, epitélio biliar, tecido conectivo e tratos portais na progressão da doença. Em situações de sobrecarga secundária (esteatohepatite alcoólica, doença hepática gordurosa não alcoólica), a deposição de ferro no fígado inicia-se nos sinusóides e a distribuição é mais difusa, podendo estar localizada na zona 1 e em hepatócitos em fases avançadas da doença (BRUNT *et al.*, 1999). Observamos ainda no presente estudo que o grau de deposição de ferro no parênquima hepático e os níveis de ferritina não tiveram associação com o grau de gravidade da doença no fígado e com o comprimento do telômero.

A avaliação do grau de fibrose e da atividade inflamatória são fundamentais para a classificação da gravidade da doença hepática. No nosso estudo evidenciamos

um expressivo grau de atividade necroinflamatória no grupo HCV, pois cerca de 80% dos indivíduos apresentaram inflamação moderada a acentuada. Na análise multivariada, observamos que os pacientes com IAH (índice de atividade inflamatória) entre 9 e 12 (inflamação moderada) apresentaram maior risco de fibrose hepática mais grave ($p < 0.01$ – IC [2,11 – 489,36]). A grande variação do intervalo de confiança deve estar provavelmente relacionada ao pequeno tamanho da amostra do grupo de fibrose grave.

Na hepatite C crônica, a lesão é caracterizada por infiltrado linfocitário portal, necrose focal e em ponte associados à degeneração lobular e fibrose, que se inicia na região periportal e progride até a formação dos nódulos de regeneração com destruição da arquitetura do órgão. Sabemos que quanto mais intensa a agressão ao parênquima hepático, maior a resposta imune local. Pawlotsky (2004) relacionou a gravidade da lesão hepática com a expressão de citocinas inflamatórias no parênquima hepático.

Alguns modelos animais de cirrose foram desenvolvidos, avaliando a variação do tamanho do telômero na evolução da doença. Estudos em humanos demonstraram que o encurtamento do telômero é um marcador para o desenvolvimento de cirrose, concomitante ao acúmulo de hepatócitos senescentes (KOJIMA *et al.*, 1997; WIEMANN *et al.*, 2002). Além disso, os estudos em animais com deficiência de telomerase forneceram a primeira evidência experimental que o encurtamento dos telômeros limita a resposta regenerativa ao dano hepático agudo e crônico, acelerando a formação de fibrose hepática e esteatose (RUDOLPH *et al.*, 1999).

No presente pesquisa observamos que não há uma associação direta entre a gravidade de doença hepática e o comprimento telomérico aferido em amostras de sangue periférico ou em tecido hepático de portadores de hepatite C crônica. No entanto, observamos telômero mais longo no fígado que no sangue periférico dos pacientes portadores de HCV.

Em 2014, Dlouha e colaboradores fizeram a comparação do comprimento do telômero em onze diferentes tecidos humanos de doze cadáveres (leucócitos de sangue periférico, fígado, rins, coração, baço, cérebro, pele, tríceps, mucosa lingual, músculo intercostal, gordura subcutânea e gordura abdominal) e compararam os resultados encontrados no mesmo indivíduo. Neste trabalho, o comprimento do telômero no fígado foi menor que em leucócitos. No entanto, a população desse estudo não tinha história previa de inflamação sistêmica, como a hepatite C crônica,

não sendo possível a comparação direta com nosso estudo. No entanto, os autores também observaram a heterogeneidade do CT dentre órgãos do mesmo indivíduo.

O encurtamento dos telômeros não é uniforme entre os tecidos (por exemplo, o cérebro e coração mostram pouco encurtamento) ou entre as várias células dentro de um tecido (CALADO; YOUNG, 2009).

Sabemos que o fígado é composto de células parenquimatosas (hepatócitos), que compreendem 60% do total das células e 90% da massa hepática, e células não parenquimatosas (células endoteliais, células de Kupffer, linfócitos e células estreladas). Este órgão tem uma capacidade única de regular seu crescimento e reparação, o que é particularmente notável, uma vez que os hepatócitos são células altamente diferenciadas, estáveis e raramente dividem-se no estado normal, permanecendo inativas na fase G0 do ciclo celular (RAMALHO *ET AL.*, 1993; DIEHL; RAI, 1996; MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). No entanto, sua capacidade proliferativa é iniciada no caso de perda de tecido hepático (hepatectomia parcial) ou secundária a um insulto hepático, como toxinas e infecções, como no caso da hepatite C crônica.

Ao passo que os leucócitos de sangue periférico são compostos por diferentes linhagens celulares, e as suas proporções no sangue variam mesmo em indivíduos saudáveis. Os neutrófilos compõem 40-70% dos leucócitos, e têm uma meia vida muito curta de apenas 1-3 dias devido à alta capacidade proliferativa. Dessa forma, percebemos a particularidade biológica de cada órgão e a real limitação em estender resultados obtidos em sangue periférico para análise de outros tecidos.

Ao compararmos o comprimento telomérico de pacientes com HCV entre os sexos feminino e masculino, observamos medianas semelhantes em sangue periférico e tecido hepático (0,63 e 0,70; 1,14 e 1,18, respectivamente), não tendo diferença significativa entre os grupos, com valores de $p = 0,62$ e $p = 0,10$, respectivamente. Quando avaliamos os controles saudáveis, também não encontramos diferença estatística entre os sexos.

Diferenças de gênero específico em relação ao comprimento telomérico em função da idade foi verificada em observações anteriores (BENETOS *et al.*, 2001; MAYER *et al.*, 2006; BEKAERT *et al.*, 2007; BARRETT; RICHARDSON, 2011), notando-se que os telômeros parecem ser, em média, um pouco maior em mulheres do que em homens. Carrero *et al.* (2008) concluíram que a idade e o gênero masculino pareciam ser importantes fatores para reduzir o comprimento telomérico em pacientes

com doença renal crônica, aumentando o risco de mortalidade nestes indivíduos.

Em um estudo realizado por Aubert *et al.* (2012) com indivíduos saudáveis, variando de zero a 100 anos, observou-se uma superioridade na média do comprimento telomérico de 414 mulheres em relação aos 418 homens analisados. No entanto, essa diferença não mostrou um valor estatístico quando se avaliou apenas recém-nascidos, indicando que possivelmente essa discrepância de tamanho dos telômeros entre os gêneros seja nula ou muito baixa nas primeiras fases da vida.

Na nossa casuística, não encontramos diferença do CT entre os sexos. No entanto, ressaltamos que apenas 17% da coorte avaliada foi representada por mulheres e com faixa pequena de variação da idade (39 - 65 anos, com média de 49 anos), o que pode explicar os resultados encontrados.

Sabe-se que há diminuição progressiva no comprimento telomérico, em média 50 pb (pares de base)/ano em uma população adulta saudável (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990; AUBERT *et al.*, 2012). Na nossa coorte, subdividimos os pacientes em dois grupos (≥ 40 anos e < 40 anos), não sendo observada diferença estatística no tamanho do telômero entre os grupos, tanto na avaliação de sangue periférico como no tecido hepático ($p=0,40$ e $p=0,70$, respectivamente). Nossa amostra tem uma faixa de variação de idade pequena [49,2 anos ($\pm 10,8$)], pois o diagnóstico da hepatite C crônica costuma ser por volta da 4ª e 5ª décadas, o que pode justificar a não variação do comprimento do telômero com essa variável.

Wiemann *et al.* (2002) na avaliação do CTf de 72 pacientes portadores de cirrose hepática com etiologias diversas, sendo 12 Child A, 32 Child B e 28 Child C segundo a classificação de Child-Pugh, observaram redução do CTf nos pacientes portadores de cirrose quando comparado aos controles, independente na etiologia. Não houve variação do CTf em relação a idade nos grupos dos cirróticos e não houve diferença do CTf entre Child-Pugh A, B e C, corroborando com o presente estudo. Ressaltamos que o grupo controle dessa pesquisa foi constituído de amostras de fígados advindas de pacientes com falência hepática aguda, doença hepática cística e de hepatectomias de pacientes com metástases hepáticas, condições essas potencialmente modificadoras do comprimento telomérico.

Kitada *et al.* (1995) avaliaram 28 amostras de fígado de portadores de doenças hepáticas com várias etiologias (viral, alcoólica, autoimune) tendo encontrado telômeros mais curtos nos portadores de cirrose e hepatite crônica quando comparados aos dos controles saudáveis. No entanto, não foi encontrada diferença

estatisticamente significativa comparando-se os portadores de cirrose hepática e de hepatite crônica. Kojima *et al.* (1997) também descrevem resultados semelhantes à Kitada *et al.* (1995). Tais dados vem ao encontro dos nossos resultados, uma vez que não vimos diferença do tamanho do telômero entre os graus de gravidade de acometimento do parênquima.

Vale ressaltar que divergências no desenho do estudo, critérios diferentes de inclusão e exclusão, diversas técnicas de extração de DNA e de aferição do comprimento do telômero entre os estudos pode restringir as comparações. Nossa coorte tem apenas uma etiologia para a doença hepática, o mesmo genótipo em todos os pacientes avaliados e conseguimos avaliar o comprimento do telômero em sangue e em tecido hepático de um número significativo da amostra.

A função hepática estava preservada em 95% da amostra estudada. O grupo de fibrose grave foi constituído por pacientes com fibrose hepática grau 3 (F3) e 4 (F4), conforme a classificação de METAVIR. Infelizmente, o número de pacientes com F4, considerados portadores de cirrose propriamente dita, foi demasiadamente pequeno; das 82 amostras avaliadas de sangue periférico, apenas 4 eram F4 e das 52 amostras avaliadas de tecido hepático, apenas 3 eram F4. Esse viés foi devido à escassez de amostras de tecido hepático estocadas, uma vez que não foram realizadas biópsias fora do protocolo de assistência seguido no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. E, naqueles pacientes que têm cirrose hepática com diagnóstico clínico, laboratorial e/ou radiológico apenas, em sua maioria, a biópsia hepática é dispensável para o seguimento clínico e sua realização imputaria riscos desnecessários ao paciente.

Atualmente sabemos que o comprimento do telômero pode também ser regulado por fatores epigenéticos, relacionados aos fatores ambientais externos como tabagismo, radiação ultravioleta - UV (GARCÍA-CAO *et al.*, 2004; CASSIDY *et al.*, 2010; STRANDBERG *et al.*, 2012). Tabagismo, dieta, *status* socioeconômico, nível de estresse e estilo de vida podem influenciar na dinâmica telomérica (GETLIFFE *et al.*, 2005; EPEL *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2009; MIRABELLO *et al.*, 2010). No entanto esses dados não foram avaliados no presente estudo.

Telomeropatias e a presença de mutações nos genes da telomerase têm sido relatadas e melhor esclarecidas atualmente, como a anemia aplástica, disceratose congênita, alguns casos de fibrose pulmonar idiopática familiar e cirrose.

A disceratose congênita é a mais evidente e grave manifestação de lesões genéticas relacionada às telomeropatias, tem alta penetrância genética e importantes manifestações clínicas. No entanto, as mutações da telomerase também podem ser menos penetrantes e induzir menores danos aos pacientes na idade adulta, tendo maior influência de fatores epigenéticos e ambientais (alcoolismo, tabagismo, exposição a vírus/toxinas, por exemplo). Muitas pessoas com mutações em *TERT* e *TERC* têm expectativas de vida normal (CALADO; YOUNG, 2009).

Estudos recentes sugerem que a disfunção telomérica tem dois papéis na progressão do câncer e da carcinogênese, incluindo hepatocarcinogênese. Sabe-se que as células somáticas precisam de comprimento telomérico em um nível de equilíbrio para manter a proliferação celular, senescência e apoptose. Na presença de telômeros excessivamente curtos há maior risco de alterações cromossômicas e quando há telômeros mais longos, a senescência e a apoptose são atrasadas, o que resulta em maior tempo de vida das células, mais divisões celulares e, potencialmente, mais alterações genéticas podem advir. Dessa forma, alterações do comprimento telomérico podem levar à instabilidade cromossômica, iniciando a hepatocarcinogênese (FELDSER; HACKETT; GREIDER, 2003; HACKETT; GREIDER, 2003; SATYANARAYANA; MANNS; RUDOLPH, 2004; COSME-BLANCO; CHANG, 2008).

Um dos eventos moleculares subjacentes ao processo multigenético de hepatocarcinogênese é a ativação da telomerase, a qual é normalmente suprimida na maior parte das células somáticas, mas altamente ativa na maioria dos tipos de câncer (KIM *et al.*, 1994; NAKAYAMA *et al.*, 1998), sugerindo que esta enzima pode ser importante para o crescimento e progressão das células cancerígenas. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela ativação da telomerase ainda são pouco conhecidos.

Até agora, existem vários estudos focados na associação entre CT e doenças hepáticas, incluindo cirrose e carcinoma hepatocelular. Foi observado encurtamento gradual do CT durante a hepatocarcinogênese (de nódulos displásicos de baixo grau, de nódulos displásicos de alto grau, *loci* de CHC ao CHC), sendo observados CT mais curtos nos nódulos com displasia de alto grau e no CHC, o que foi significativamente correlacionado com a instabilidade cromossômica (LEE *et al.*, 2009).

Na presente investigação observamos que o comprimento do telômero medido em tecido hepático foi significativamente maior em pacientes portadores de hepatite

C crônica, o que pode apontar a existência de ativação do sistema de reparação do órgão à lesão crônica sofrida com ativação de mecanismos para tentar manter a estabilidade cromossômica. Entretanto, não trabalhamos com controle saudável de tecido hepático.

Em 2012, Wan e colaboradores avaliaram a associação entre o comprimento do telômero no sangue periférico de 200 pacientes portadores de hepatite B crônica e o risco de cirrose hepática e demonstraram que os pacientes cirróticos tinham telômeros mais longo, medidos por meio da técnica de qPCR, do que os não-cirróticos e que quanto mais longo CT maior era o risco de cirrose (*odds ratio*, 2,76, 95% IC, 1,50–5,10; $p = 0,001$). Em outro estudo, pesquisadores revelaram que o CT em sangue periférico de 140 portadores de HBV e CHC foi mais longo do que em 280 controles portadores de HBV na ausência de carcinoma (FU *et al.*, 2012). Não encontramos diferença do CT entre os diferentes graus de fibrose em sangue periférico; no entanto nossa pesquisa referiu-se apenas aos pacientes com HCV e não portadores de hepatocarcinoma.

O encurtamento de telômeros é comumente encontrado em tecidos neoplásicos, no entanto, o seu alongamento tem sido observado em vários tumores em estágio avançado, incluindo câncer colorretal e de cabeça e pescoço (PLENTZ *et al.*, 2003). Nos tecidos do CHC, os telômeros longos e o aumento da atividade da telomerase podem refletir em fatores prognósticos ruins, associados às características clinicopatológicas do comportamento agressivo (OH *et al.*, 2003). A progressão tumoral está associada à supra-regulação de TERT em nódulos hepáticos displásicos independentemente da etiologia da doença hepática (RUDOLPH *et al.*, 1999; OH *et al.*, 2003; JU; RUDOLPH, 2006; LLOVET *et al.*, 2006; SAINI *et al.*, 2009; DONATI; VALENTI, 2016).

De acordo com um estudo realizado por Calado *et al.* (2011) com 134 pacientes cirróticos, verificou-se que a frequência cumulativa de mutações no gene TERT é significativamente maior ($p = 0.0009$), comparada a 528 controles saudáveis. Hartmann *et al.* (2011) em um estudo similar realizado com 521 portadores de cirrose verificaram que 14 deles apresentavam mutações na telomerase, sendo que destes, 5 evoluíram para CHC (36%). Isso indica que mutações na telomerase poderiam estar associadas a progressão mais agressiva da doença hepática crônica.

O sequenciamento de vários éxons de *TERT* em 96 amostras de sangue periférico de portadores de HCV não detectou mutações. Esse resultado pode estar

relacionado ao fato de nossa casuística não incluir pacientes com hepatocarcinoma.

A hepatite C crônica é considerada uma condição pré-neoplásica importante. Estudos mostraram que a maioria dos carcinomas hepatocelulares surge neste cenário patológico (COLEMAN, 2003). Há evidências sugerindo que o ciclo celular de renovação dos hepatócitos é um mecanismo primário de encurtamento de telômeros na infecção pelo HCV, induzindo à fibrose e à senescência do órgão. O ciclo dos hepatócitos fica acelerado pela lesão crônica e progressiva provocada pelo HCV, com influência epigenética e ambiental. Isso leva à produção de populações monoclonais de hepatócitos aberrantes e displásicos, que são caracterizadas por erosão telomérica e reativação da telomerase e, ocasionalmente, instabilidade microssatélite e aberrações genéticas ou cromossômicas estruturais (MISE *et al.*, 1998; SEKOGUCHI *et al.*, 2007).

A maioria dos cânceres humanos (cerca de 85%) reativam a telomerase para contornar o encurtamento dos telômeros, conseguindo assim uma capacidade ilimitada de divisão celular (SHAY; BACCHETTI, 1997). Mutações somáticas na região promotora do gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase (TERTp) têm sido implicadas na tumorigênese, já que essas mutações desencadeiam a regulação positiva da TERT e a reativação da telomerase (HUANG *et al.*, 1998; HORN *et al.*, 2013). No câncer de fígado, mutações e alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região TERTp são indicativos de mau prognóstico (KO *et al.*, 2016; SHEN *et al.*, 2017). No contexto de dano hepático crônico, mutações no TERTp podem predispor ao CHC.

No presente estudo, detectamos um SNP na região TERTp (rs2853669) em 55% dos pacientes com hepatopatias crônicas secundárias à infecção pelo HCV.

As mutações do promotor TERT são importantes alterações genômicas no passo a passo hepatocarcinogênico, que está envolvido no CHC desenvolvido a partir de doença hepática crônica (PILATI *et al.*, 2014; PINYOL; TOVAR; LLOVET, 2014; KO *et al.*, 2016). Nault *et al.* (2014) mostraram que as mutações TERTp são determinantes fundamentais para o CHC, pois são observadas em nódulos displásicos de baixo ou alto grau (LGDNs, HGDNs), enquanto outras mutações em diferentes genes de câncer (como *CTNNB1*, *TP53*, *ARID1A*, *ARID2*, *NFE2L2*, *AXIN1*, *PIK3CA*, *KEAP1*, *RPS6KA3* e *CDKN2A*) não foram observados em fígados cirróticos, LGDNs ou HGDNs.

Os tumores CHC abrigando o polimorfismo rs2853669 combinado com

mutações somáticas de TERTp (como 12124C> T e -146C> T) exibem expressão de *TERT* aumentada e telômeros mais longos comparados aos tumores com mutações TERTp apenas. Este polimorfismo, em combinação com mutações TERTp, leva às mudanças no padrão de metilação da região TERTp, aumentando a expressão de *TERT* e refletindo sobre as taxas de sobrevida ruim dos pacientes com CHC (KO *et al.*, 2016). Esse estudo destaca que alguns SNP, em combinação com outros SNP ou alterações genéticas, podem trazer implicações clínicas.

No presente estudo, o sequenciamento da região promotora de *TERT* de tecidos hepáticos de 52 pacientes não detectou qualquer das variantes patogênicas previamente descritas no câncer, como C228T e C250T. No entanto, o SNP rs2853669 foi encontrado enriquecido nos pacientes com fibrose leve quando comparados ao gnomAD ou ABraOM, sugerindo que esse SNP pode estar associado a um melhor prognóstico. Não há registros de casos de CHC em nenhum dos pacientes portadores de SNP rs2853669, até o presente momento.

Desse modo, ressalta-se a complexidade dos mecanismos genéticos e ambientais envolvidos na suscetibilidade ou na proteção à infecção viral e na progressão da doença hepática secundária à hepatite C crônica e a importância de estudá-los para o maior entendimento da afecção, permitindo melhor condução dos pacientes.

Conclusões

10 CONCLUSÕES

Na população estudada, encontramos telômeros maiores no tecido alvo da lesão produzida pelo HCV e um risco maior de fibrose mais grave entre os pacientes com telômeros longos. No entanto, o comprimento dos telômeros não parece interferir como um fator independente na gravidade da doença hepática.

Na população do estudo não houve correlação entre o comprimento do telômero em sangue periférico e em tecido hepático em pacientes portadores de hepatite C crônica.

Os fatores de risco epidemiológicos e o grau de esteatose não influenciaram no comprimento do telômero e na progressão da fibrose hepática.

O grau de atividade inflamatória moderado foi fator de risco independente para fibrose hepática grave.

O SNP rs2853669 foi encontrado enriquecido em pacientes com fibrose mais leve, sugerindo que esse SNP pode estar associado a um melhor prognóstico.

Dessa forma, destacamos a importância dos fatores genéticos na doença hepática secundária ao VHC. Faz-se necessário que eles sejam cada vez mais compreendidos a fim de um melhor entendimento da fisiopatologia da lesão hepática pelo HCV, objetivando melhorar o cuidado dos nossos pacientes.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

- AFDHAL, N. H. The natural history of hepatitis C. **Semin Liver Dis**, New York, v. 24, Suppl. 2, p. 3-8, 2004.
- AIKATA, H. *et al.* Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. **Exp Cell Res**, New York, v. 256, n. 2, p. 578-582, May 2000.
- AL-KUBAISY, W. *et al.* Is dental extraction a risk factor for contracting HCV infection: Abs, RNA and genotype detection. **Oral Biol Dent**, Telangana, v. 2, n. 7, 2014.
- ARIEDE, J. R. **Avaliação da carga viral do vírus da hepatite C em diferentes compartimentos biológicos**: influência na predição da recidiva virológica. Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto. 2013. 78 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.
- ARMANIOS, M. Y. *et al.* Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. **N Engl J Med**, Boston, v. 356, n. 13, p. 1317-1326, Mar. 2007.
- AUBERT, G. *et al.* Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. **PLoS Genet**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e1002696, 2012.
- BALL, J. K.; TARR, A. W.; MCKEATING, J. A. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. **Antiviral Res**, Amsterdam, v. 105, p. 100-111, May 2014.
- BARRETT, E. L.; RICHARDSON, D. S. Sex differences in telomeres and lifespan. **Aging Cell**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 913-921, Dec. 2011.
- BARTON, J. C. *et al.* Iron overload in African Americans. **Am J Med**, New York, v. 99, n. 6, p. 616-623, Dec. 1995.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, New Haven, v. 115, n. 2, p. 209-218, Feb. 2005.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, n. 2, p. 289-293, Aug. 1996.
- BEKAERT, S. *et al.* Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. **Aging Cell**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 639-647, Oct. 2007.
- BENETOS, A. *et al.* Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. **Hypertension**, Dallas, v. 37, n. 2, p. 381-385, Feb. 2001.
- BLACKBURN, E. H. Telomere states and cell fates. **Nature**, London, v. 408, n. 6808, p. 53-56, Nov. 2000.

_____. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 579, n. 4, p. 859-862, Feb. 2005.

_____; GREIDER, C. W.; SZOSTAK, J. W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. **Nat Med**, New York, v. 12, n. 10, p. 1133-1138, Oct. 2006.

BLASCO, M. A. Telomere length, stem cells and aging. **Nat Chem Biol**, New York, v. 3, n. 10, p. 640-649, Oct. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. **Manual técnico para o diagnóstico das Hepatites Virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

_____. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais - v. 49**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2018.

BROUILLETTE, S. W. *et al.* Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. **Lancet**, London, v. 369, n. 9556, p. 107-114, Jan. 2007.

BRUNT, E. M. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, New York, v. 94, n. 9, p. 2467-2474, Sep. 1999.

CALADO, R. T. *et al.* Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 1600-1607, May 2011.

_____; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **N Engl J Med**, Boston, v. 361, n. 24, p. 2353-2365, Dec. 2009.

CAMPANA, L.; IREDALE, J. P. Regression of liver fibrosis. **Semin Liver Dis**, New York, v. 37, n. 1, p. 1-10, Feb. 2017.

CAMPIOTTO, S. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 41-49, Jan. 2005.

CARNEIRO, M. V. *et al.* The H63D genetic variant of the HFE gene is independently associated with the virological response to interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, London, v. 22, n. 10, p. 1204-1210, Oct. 2010.

CARRERO, J. J. *et al.* Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. **J Intern Med**, Oxford, v. 263, n. 3, p. 302-312, Mar. 2008.

CASSIDY, A. *et al.* Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 91, n. 5, p. 1273-1280, May 2010.

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, London, v. 30, n. 10, p. e47, May 2002.

CHOI, J.; OU, J. H. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Bethesda, v. 290, n. 5, p. G847-G851, May 2006.

CHOO, Q. L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, New York, v. 244, n. 4902, p. 359-362, Apr. 1989.

COLEMAN, W. B. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. **Curr Mol Med**, Hilversum, v. 3, n. 6, p. 573-588, Sep. 2003.

COSME-BLANCO, W.; CHANG, S. Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. **Exp Cell Res**, Orlando, v. 314, n. 9, p. 1973-1979, Jun. 2008.

CUEVAS, J. M. *et al.* The role of positive selection in hepatitis C virus. **Infect Genet Evol**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 860-866, Sep. 2009.

DANIEL, M.; PEEK, G. W.; TOLLEFSBOL, T. O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). **Gene**, Amsterdam, v. 498, n. 2, p. 135-146, May 2012.

DAVIS, G. L. *et al.* Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. **Liver Transpl**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 331-338, Apr. 2003.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 18, p. 2100-2110, Sep. 2005.

DEUGNIER, Y. M. *et al.* Differentiation between heterozygotes and homozygotes in genetic hemochromatosis by means of a histological hepatic iron index: a study of 192 cases. **Hepatology**, Baltimore, v. 17, n. 1, p. 30-34, Jan. 1993.

DI BISCEGLIE, A. M. *et al.* Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 102, n. 6, p. 2108-2113, Jun. 1992.

DIEHL, A. M.; RAI, R. M. Liver regeneration 3: regulation of signal transduction during liver regeneration. **FASEB J**, Bethesda, v. 10, n. 2, p. 215-227, Feb. 1996.

DLOUHA, D. *et al.* Comparison of the relative telomere length measured in leukocytes and eleven different human tissues. **Physiol Res**, Praha, v. 63, Suppl. 3, p. S343-S350, 2014.

DOKAL, I. Dyskeratosis congenita in all its forms. **Br J Haematol**, Oxford, v. 110, n. 4, p. 768-779, Sep. 2000.

DONATI, B.; VALENTI, L. Telomeres, NAFLD and chronic liver disease. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 17, n. 3, p. 383, Mar. 2016.

DUARTE, C. A. B. **Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em tempo-real**. Orientador: Marco Aurélio Krieger. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DUBUISSON, J.; COSSET, F. L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 61, n. 1, p. S3-S13, Nov. 2014.

EPEL, E. S. *et al.* Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 277-287, Apr. 2006.

FALCÓN, V. *et al.* Ultrastructural and biochemical basis for hepatitis C virus morphogenesis. **Virus Genes**, Boston, v. 53, n. 2, p. 151-164, Apr. 2017.

FARCI, P.; BUKH, J.; PURCELL, R. H. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. **Springer Semin Immunopathol**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 5-26, 1997.

FELDSER, D. M.; HACKETT, J. A.; GREIDER, C. W. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. **Nat Rev Cancer**, London, v. 3, n. 8, p. 623-627, Aug. 2003.

FLORES, I.; BENETTI, R.; BLASCO, M. A. Telomerase regulation and stem cell behaviour. **Curr Opin Cell Biol**, London, v. 18, n. 3, p. 254-260, Jun. 2006.

FORTON, D. M.; THOMAS, H. C.; TAYLOR-ROBINSON, S. D. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. **Metab Brain Dis**, New York, v. 19, n. 3-4, p. 383-391, Dec. 2004.

FRIEDMAN, S. L.; BANSAL, M. B. Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? **Hepatology**, Baltimore, v. 43, n. 2 (Suppl 1), p. S82-8, Feb. 2006.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis - from bench to bedside. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 38, Suppl 1, p. S38-S53, 2003.

FU, X. *et al.* Relative telomere length: a novel non-invasive biomarker for the risk of non-cirrhotic hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B infection. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1014-1022, May 2012.

GALOSSO, A. *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. **J Gastrointestin Liver Dis**, Cluj-Napoca, v. 16, n. 1, p. 65-73, Mar. 2007.

GARCÍA-CAO, M. *et al.* Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. **Nat Genet**, New York, v. 36, n. 1, p. 94-99, Jan. 2004.

GETLIFFE, K. *et al.* Lymphocyte telomere dynamics and telomerase activity in inflammatory bowel disease: effect of drugs and smoking. **Aliment Pharmacol Ther**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 121-131, Jan. 2005.

GONZALEZ, M. E.; CARRASCO, L. Viroporins. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 552, n. 1, p. 28-34, Sep. 2003.

GOUTAGNY, N. *et al.* Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. **J Infect Dis**, Chicago, v. 187, n. 12, p. 1951-1958, Jun. 2003.

GREBELY, J.; MATTHEWS, G. V.; DORE, G. J. Treatment of acute HCV infection. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, London, v. 8, n. 5, p. 265-274, May 2011.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. **Cell**, Cambridge, v. 43, n. 2, p. 405-413, Dec. 1985.

GRIFFITH, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. **Cell**, Cambridge, v. 97, n. 4, p. 503-514, May 1999.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F. *et al.* Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. e113747, Nov. 2014.

HACKETT, J. A.; GREIDER, C. W. End resection initiates genomic instability in the absence of telomerase. **Mol Cell Biol**, Washington, v. 23, n. 23, p. 8450-8461, Dec. 2003.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, London, v. 345, n. 6274, p. 458-460, May 1990.

HARTMANN, D. *et al.* Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. **Hepatology**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 1608-1617, May 2011.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, New York, v. 25, n. 3, p. 585-621, Dec. 1961.

HAYFLICK, L. The cell biology of aging. **Clin Geriatr Med**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 15-27, Feb. 1985.

HEMANN, M. T. *et al.* Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. **Mol Biol Cell**, Bethesda, v. 12, n. 7, p. 2023-2030, Jul. 2001.

HÉZODE, C. *et al.* Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 31, n. 6, p. 979-984, Dec. 1999.

HÖRL, W. H.; SCHMIDT, A. Low hepcidin triggers hepatic iron accumulation in patients with hepatitis C. **Nephrol Dial Transplant**, Berlin, v. 29, n. 6, p. 1141-1144, Jun. 2013.

HORN, S. *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science**, New York, v. 339, n. 6122, p. 959-961, Feb. 2013.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Assessing the fit of the model. In: _____. **Applied Logistic Regression**. 2nd. ed. Hoboken: Wiley, 2000. p. 143-202.

HOUGHTON, M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. **Immunol Rev**, Copenhagen, v. 239, n. 1, p. 99-108, Jan. 2011.

HUANG, G. T. *et al.* Telomerase activity and telomere length in human hepatocellular carcinoma. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1946-1949, Nov. 1998.

IMBERT, I. *et al.* Réplication du virus de l'hépatite C: systèmes d'étude, avantages et limites. **Virologie**, Bucuresti, v. 8, n. 4, p. 281-295, Jul. 2004.

ISHII, S.; KOZIEL, M. J. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. **Clin Immunol**, Orlando, v. 128, n. 2, p. 133-147, Aug. 2008.

JADOON, N. A. *et al.* Seroprevalence of hepatitis C in type 2 diabetes: evidence for a positive association. **Virol J**, London, v. 7, p. 304, Nov. 2010.

JU, Z.; RUDOLPH, K. L. Telomeres and telomerase in cancer stem cells. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1197-1203, Jun. 2006.

KAITO, M. *et al.* Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol**, London, v. 75, n. 7, p. 1755-1760, Jul. 1994.

KARTASHEV, V. *et al.* New findings in HCV genotype distribution in selected West European, Russian and Israeli regions. **J Clin Virol**, Amsterdam, v. 81, p. 82-89, Aug. 2016.

KAZEMI-SHIRAZI, L. *et al.* The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 116, n. 1, p. 127-134, Jan. 1999.

KELL, D. B.; PRETORIUS, E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. **Metallomics**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 748-773, Apr. 2014.

KIM, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, New York, v. 266, n. 5193, p. 2011-2015, Dec. 1994.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 21, Suppl 3, p. S84-S87, Oct. 2006.

KITADA, T. *et al.* Telomere shortening in chronic liver diseases. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 211, n. 1, p. 33-39, Jun. 1995.

KNODELL, R. G. *et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. **Hepatology**, Baltimore, v. 1, n. 5, p. 431-435, Sep-Oct. 1981.

KO, E. *et al.* The TERT promoter SNP rs2853669 decreases E2F1 transcription factor binding and increases mortality and recurrence risks in liver cancer. **Oncotarget**, Albany, v. 7, n. 1, p. 684-699, Jan. 2016.

KOJIMA, H. *et al.* Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 112, n. 2, p. 493-500, Feb. 1997.

KOLQUIST, K. A. *et al.* Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. **Nat Genet**, New York, v. 19, n. 2, p. 182-186, Jun. 1998.

KOUTSOUDAKIS, G. *et al.* Interplay between basic residues of hepatitis C virus glycoprotein E2 with viral receptors, neutralizing antibodies and lipoproteins. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e52651, 2012.

KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods Mol Biol**, Totowa, v. 510, p.33-53, 2009.

LAZZERINI DENCHI, E.; CELLI, G.; DE LANGE, T. Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 19, p. 2648-2653, Oct. 2006.

LEE, Y. H. *et al.* Chromosomal instability, telomere shortening, and inactivation of p21 WAF1/CIP1 in dysplastic nodules of hepatitis B virus-associated multistep hepatocarcinogenesis. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 22, n. 8, p. 1121-1131, Aug. 2009.

LEK, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, London, v. 536, n. 7616, p. 285-291, Aug. 2016.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 11, n. 10, p. 688-700, Oct. 2013.

LIU, D. *et al.* Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 279, n. 49, p. 51338-51342, Dec. 2004.

LIU, X. *et al.* Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts. **Curr Pathobiol Rep**, United States, v. 1, n. 3, p. 209-214, Sep. 2013.

LLOVET, J. M. *et al.* A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 131, n. 6, p. 1758-1767, Dec. 2006.

- LU, L. *et al.* The full-length genome sequences of nine HCV genotype 4 variants representing a new subtype 4s and eight unclassified lineages. **Virology**, New York, v. 482, p. 111-116, Aug. 2015.
- MANDELL, G.; BENNETT, J.; DOLIN, R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.
- MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, n. 5(Supp 1), p. S47-S56, Nov. 2002.
- MARTELL, M. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol**, Baltimore, v. 66, n. 5, p. 3225-3229, May 1992.
- MARTINELLI, A. L.; RAMALHO, L. N.; ZUCOLOTO, S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 19, n. 1, p. 91-98, Jan. 2004.
- MAYER, S. *et al.* Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans. **Cytogenet Genome Res**, Basel, v. 112, n. 3-4, p. 194-201, 2006.
- MESSINA, J. P. *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 77-87, Jan. 2015.
- METWALLY, M. A.; ZEIN, C. O.; ZEIN, N. N. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. **Am J Gastroenterol**, Philadelphia, v. 99, n. 2, p. 286-291, Feb. 2004.
- MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, New York, v. 276, n. 5309, p. 60-66, Apr. 1997.
- MIRABELLO, L. *et al.* The association of telomere length and genetic variation in telomere biology genes. **Hum Mutat**, New York, v. 31, n. 9, p. 1050-1058, Sep. 2010.
- MISE, K. *et al.* Assessment of the biological malignancy of hepatocellular carcinoma: relationship to clinicopathological factors and prognosis. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 4, n. 6, p. 1475-1482, Jun. 1998.
- MOHAMADKHANI, A.; POURASGARI, M.; POUSTCHI, H. Significant SNPs related to Telomere Length and Hepatocellular Carcinoma Risk in Chronic Hepatitis B Carriers. **Asian Pac J Cancer Prev**, Bangkok, v. 19, n. 3, p. 585-590, 2018.
- MULLER, H. J. The remaking of chromosomes. **Collecting net**, Falmouth, v. 13, p. 181-198, 1938.
- NAKAYAMA, J.I. *et al.* Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. **Nat Genet**, New York, v. 18, n. 1, p. 65-68, Jan. 1998.

NASLAVSKY, M. S. *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat**, New York, v. 38, n. 7, p. 751-763, Jul. 2017.

NAULT, J. C. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 60, n. 6, p. 1983-1992, Dec. 2014.

NEUMANN, A. U. *et al.* Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. **Science**, New York, v. 282, n. 5386, p. 103-107, Oct. 1998.

NOUROZ, F. *et al.* An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. **Egyptian Society of Human Genetics**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 291-298, Oct. 2015.

OH, B.-K. *et al.* Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. **J Hepatol**, Copehnagen, v. 39, n. 5, p. 786-792, Nov. 2003.

OLOVNIKOV, A. M. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. **Dokl Akad Nauk SSSR**, Moskva, v. 201, n. 6, p.1496-1499, 1971.

_____. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **J Theor Biol**, London, v. 41, n. 1, p. 181-190, Sep. 1973.

OLYNYK, J. K. *et al.* Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 108, n. 4, p. 1104-1109, Apr. 1995.

PAWLOTSKY, J. M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 96-102, Feb. 2004.

PETRUZZIELLO, A. *et al.* Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an update of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 22, n. 34, p. 7824-40, Sep. 2016.

PIETRANGELO, A. Hemochromatosis gene modifies course of hepatitis C viral infection. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 124, n. 5, p. 1509-1523, May 2003.

PILATI, C. *et al.* Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 25, n. 4, p. 428-441, Apr. 2014.

PINYOL, R.; TOVAR, V.; LLOVET, J. M. TERT promoter mutations: gatekeeper and driver of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, Copehnagen, v. 61, n. 3, p. 685-687, Sep. 2014.

PLENTZ, R. *et al.* Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. **Gut**, London, v. 52, n. 9, p. 1304-1307, Sep. 2003.

POWDRILL, M. H. *et al.* Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 108, n. 51, p. 20509-20513, Dec. 2011.

POYNARD, T. *et al.* A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 38, n. 3, p. 257-265, Mar. 2003.

PRICE, L.; KOWDLEY, K. V. The role of iron in the pathophysiology and treatment of chronic hepatitis C. **Can J Gastroenterol**, Oakville, v. 23, n. 12, p. 822-828, Dec. 2009.

RAMALHO, F. S. *et al.* Regeneração hepática: algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cir Brasil**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 177-89, 1993.

RAMIREZ, S. *et al.* Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. **Am J Transplant**, Copenhagen, v. 9, n. 7, p. 1591-1601, Jul. 2009.

ROMAN, F. *et al.* Hepatitis C virus genotypes distribution and transmission risk factors in Luxembourg from 1991 to 2006. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 14, n. 8, p. 1237-1243, Feb. 2008.

RUDOLPH, K. L. *et al.* Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. **Cell**, Cambridge, v. 96, n. 5, p. 701-712, Mar. 1999.

SAINI, N. *et al.* Telomerase activity, telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression in hepatocellular carcinoma is independent of hepatitis virus status. **Liver Int**, Malden, v. 29, n. 8, p. 1162-1170, Sep. 2009.

SATYANARAYANA, A.; MANNS, M. P.; RUDOLPH, K. L. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, Baltimore, v. 40, n. 2, p. 276-283, Aug. 2004.

SAUTTO, G. *et al.* Structural and antigenic definition of hepatitis C virus E2 glycoprotein epitopes targeted by monoclonal antibodies. **Clin Dev Immunol**, Cario, v. 2013, p. 450963, 2013.

SEBASTIANI, G.; GKOUVATSOS, K.; PANTOPOULOS, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 20, n. 32, p. 11033-11053, Aug. 2014.

SEKOGUCHI, S. *et al.* Role of cell-cycle turnover and oxidative stress in telomere shortening and cellular senescence in patients with chronic hepatitis C. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 22, n. 2, p. 182-190, Feb. 2007.

SHAY, J. W.; BACCHETTI, S. A survey of telomerase activity in human cancer. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 787-791, Apr. 1997.

SHEHAB, T. Hepatitis C: an emerging epidemic. **Clin Fam Pract**, London, v. 6, n. 3, p. 589-605, Sep. 2004.

SHEN, N. *et al.* Association between rs2853669 in TERT gene and the risk and prognosis of human cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 31, p. 50864-50872, Feb. 2017.

SHUKLA, D. D.; HOYNE, P. A.; WARD, C. W. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Arch Virol**, New York, v. 140, n. 10, p. 1747-1761, 1995.

SILVA, L. K. *et al.* Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 5, p. 595-602, May 2006.

SMITH, D. B. *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 318-327, Jan. 2014.

SOUSA, F. F. **Papel dos depósitos de ferro no fígado e das mutações do gene HFE (C282Y e H63D) como fatores preditivos de progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.** 2007. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

_____. **Papel dos polimorfismos -238 A/G e -308 A/G do fator de necrose tumoral – alfa (TNF – α), -137 C/G e -607 C/A da interleucina -18n (IL-18), +874 A/T do do interferon-gama (IFN- γ) e 14 pares de bases D/I do HLA-G na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.** 2011. 176 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

STEWART, S. A.; WEINBERG, R. A. Telomeres: cancer to human aging. **Annu Rev Cell Dev Biol**, Palo Alto, v. 22, p. 531-557, 2006.

STRANDBERG, T. E. *et al.* Association between alcohol consumption in healthy midlife and telomere length in older men. The Helsinki Businessmen Study. **Eur J Epidemiol**, Dordrecht, v. 27, n. 10, p. 815-822, Oct. 2012.

STRAUSS, E. Hepatitis C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 34, n. 1, p. 69-82, fev. 2001.

SZOSTAK, J. W.; BLACKBURN, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. **Cell**, Cambridge, v. 29, n. 1, p. 245-255, May 1982.

THEIN, H. H. *et al.* Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. **Hepatology**, Baltimore, v. 48, n. 2, p. 418-431, Aug. 2008.

TSAKIRI, K. D. *et al.* Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 104, n. 18, p. 7552-7557, May 2007.

URABE, Y. *et al.* Telomere length in human liver diseases. **Liver**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 293-297, Oct. 1996.

VIEIRA, A. *et al.* Hepatite C: casuística da consulta de hepatologia de um hospital distrital. **J Port Gastreenterol.**, Lisboa, v. 14, n. 3, p. 134-140, maio 2007.

WAN, S. *et al.* Telomere length in circulating serum DNA as a novel non-invasive biomarker for cirrhosis: a nested case - control analysis. **Liver Int**, Malden, v. 32, n. 8, p. 1233-1241, Sep. 2012.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, London, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **J Hepatol**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. S58-S68, Nov. 2014.

WIEMANN, S. U. *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. **FASEB J**, Bethesda, v. 16, n. 9, p. 935-942, Jul. 2002.

WOO, J. *et al.* Green space, psychological restoration, and telomere length. **Lancet**, London, v. 373, n. 9660, p. 299-300, Jan. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global Hepatitis Report**. Geneva: World Health Organization, 2017.

YANG, C. H. T.; YOO, E. R.; AHMED, A. The role of direct-acting antivirals in the treatment of children with chronic hepatitis C. **J Clin Transl Hepatol**, Hong Kong, v. 5, n. 1, p. 59-66, Mar. 2017.

ZOU, D. M.; SUN, W. L. Relationship between hepatitis C virus infection and iron overload. **Chin Med J (Engl)**, Beijing, v. 130, n. 7, p. 866-871, Apr. 2017.