

CAROLINE MANCHIERO

**Impacto da expressão do gene PNPLA3 na esteatose hepática em
pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Mitiko
Tengan

São Paulo

2016

CAROLINE MANCHIERO

**Impacto da expressão do gene PNPLA3 na esteatose hepática em
pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Mitiko
Tengan

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Manchiero, Caroline

Impacto da expressão do gene PNPLA3 na esteatose hepática em pacientes
com infecção pelo vírus da hepatite C / Caroline Manchiero . -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Fátima Mitiko Tengan.

Descritores: 1.Hepatite C 2.Cirrose hepática 3.Fígado gorduroso 4.Fibrose
5.Polimorfismo de nucleotídeo único 6.Hepacivirus

USP/FM/DBD-406/16

Dedico essa dissertação à minha mãe Luzia de Fátima Pascoal Manchiero (in memoriam), que tanto lutou contra a hepatite C, minha maior incentivadora, àquela que mais acreditou em mim. A ela meu amor e gratidão.

Ao meu pai Hermínio Manchiero, por tudo o que faz por mim, pelo amor, incentivo e exemplo de caráter.

À minha irmã Franciane Manchiero de Souza, por todo carinho e compreensão.

Aos queridos, Enzo e Murilo, vocês tornaram meu caminho mais doce e suave.

Aos pacientes com hepatite C, os grandes personagens dessa história. Sem vocês esse trabalho não seria real.

Agradecimentos

À Deus e à Nossa Senhora por me concederem sabedoria para seguir em frente, força para não desistir, amparo nos momentos difíceis e por me presentear com pessoas amigas e preciosas no meu caminho.

À minha orientadora, Professora Dra. Fátima Mitiko Tengan, pelos ensinamentos, amizade e grande contribuição para o meu crescimento profissional durante esses anos dedicados à pesquisa, bem como pela confiança e paciência dispensadas a mim.

À pesquisadora e grande amiga, Dra. Mariana Cavalheiro Magri, por todo apoio, incentivo, conselhos e por ser fundamental na execução da técnica desta dissertação.

Aos Professores Dr. Edson Abdala, Dr. Antonio Alci Barone, Dr. Karim Yaquub Ibrahim e Dra. Gerusa Maria Figueiredo por todos os ensinamentos transmitidos durante a minha caminhada no mestrado e ao Dr. Celso Carmo Mazza pelos ensinamentos e suporte com os pacientes.

À Bianca Peixoto Dantas e à Thamiris Vaz Gago Prata, pela amizade, incentivo e por todo apoio dedicado à execução deste trabalho.

À Mara Lucia Ribeiro Piovesan e a Clélia Venezian, por tanto carinho. Vocês foram como mães para mim.

Aos amigos do LIM 47, Carlos Eduardo de Melo, Gabriella Teixeira Garcia, Luciane Cristina Lilian Patrício Martins e Sueli Fernandes, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Aos médicos, enfermeiros e funcionários do Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, por toda colaboração.

À secretaria do curso de pós-graduação do Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias, por todo suporte durante o mestrado.

Ao Laboratório de Investigação Médica em Micologia (LIM 53), pela colaboração.

À minha família, pelo amor, apoio e motivação incondicional que sempre me direciona rumo à conquista dos meus objetivos.

Aos amigos de longa data, aos amigos da faculdade, aos amigos que ganhei em São Paulo e aos amigos que conquistei nos corredores do IMT e da FMUSP, pela amizade, por dividir os problemas e somar alegrias.

A todos que me ajudaram direta e indiretamente ao longo do mestrado.

Aos pacientes, pela colaboração e incentivo para realização deste trabalho.

Obrigada a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. As alegrias fizeram com que eu acreditasse na beleza da vida e os sofrimentos serviram para meu crescimento pessoal. Vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

*O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais
difícil da vida de alguém.*

Dalai Lama

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras e gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Infecção pelo vírus da hepatite C	1
1.1.1 Agente etiológico	1
1.1.2 Genótipos HCV	2
1.1.3 Epidemiologia	3
1.1.3.1 Distribuição geográfica do vírus da hepatite C e dos seus genótipos	3
1.1.3.2 Transmissão	4
1.1.4 História Natural	5
1.1.5 Diagnóstico	6
1.1.6 Tratamento	7
1.2 Esteatose hepática	8
1.3 Esteatohepatite não alcoólica (NASH)	9
1.4 Doença hepática gordurosa não alcoólica	9
1.5 Doença hepática gordurosa não alcoólica e PNPLA3	12
1.6 Gene PNPLA3	13
1.7 Hepatite C crônica e esteatose	15
1.8 Hepatite C e fibrose	16
1.9 Hepatite C crônica, esteatose, fibrose e PNPLA3	17
2 OBJETIVOS	22
3 MÉTODOS	23
3.1 Casuística	23
3.2 Material biológico – sangue	27
3.3 Métodos laboratoriais	28
3.3.1 Níveis séricos de HCV-RNA	28

3.3.2 Genotipagem do vírus da hepatite C	29
3.3.3 Polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3	29
3.3.3.1 Extração e purificação do DNA	29
3.3.3.2 PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - análise de tamanho de fragmentos de restrição) para o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3	30
3.4 Análise dos dados coletados	38
3.5 Aspectos éticos	39
4 RESULTADOS	41
4.1. Análise dos pacientes por tipo de estudo	41
4.2 Características gerais	42
4.3 Fatores associados à esteatose hepática	49
4.3.1 Fatores associados à esteatose hepática usando o modelo de herança dominante	55
4.3.2 Fatores associados à esteatose hepática usando o modelo de herança recessiva	56
4.4 Fatores associados à fibrose hepática	57
4.4.1 Fatores associados à fibrose hepática usando o modelo de herança dominante	65
4.4.2 Fatores associados à fibrose hepática, usando o modelo de herança recessiva	66
5 DISCUSSÃO	67
5.1 Fatores associados à esteatose hepática	67
5.2 Fatores associados a fibrose hepática	71
6 CONCLUSÕES	77
ANEXO 1	79
ANEXO 2	80
ANEXO 3	88
ANEXO 4	92
ANEXO 5	96
7 REFERÊNCIAS	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
DAA	<i>Direct acting antiviral</i> ou Antiviral de ação direta
DHGA	Doença hepática gordurosa alcóolica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM	Diabete mellitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ou ensaio de imunoabsorção enzimática
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
GGT	Gama glutamil transferase
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> ou Vírus da Hepatite B
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> ou Vírus da Hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	<i>Homeostatic model assessment</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> ou Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
IL28B	Interleucina 28 B
MTTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LIM	Laboratório de Investigação Médica
máx.	Máximo
mín.	Mínimo
NAS	<i>Nonalcoholic fatty liver</i> ou Esteatose não alcóolica
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i> ou Esteatohepatite não alcóolica
NCR	<i>Non coding region</i> ou região não codificante
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou reação em cadeia pela polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase – Análise de tamanho de fragmentos de restrição
PNPLA3	<i>Patatin-like Phospholipase Domain-containing 3</i>
Profa.	Professora
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	Fase Aberta de Leitura
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> ou Análise de tamanho de fragmento de restrição
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucleico
RVS	Resposta virológica sustentada
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ou polimorfismo de um único nucleotídeo
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Tris-Borato EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UTR	<i>Untranslated region</i> ou região não traduzida
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization ou Organização Mundial da Saúde
°C	Graus Celsius
Kg	Quilograma
kg/m ²	Quilograma por metro cúbico
µL	Microlitro
>	Maior

<	Menor
=	Igual
∞	Infinito

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 -	Localização do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 no cromossomo 22	14
Figura 2 -	Análise do produto amplificado do gene PNPLA3	35
Figura 3 -	Análise do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) do produto amplificado do gene PNPLA3	37
Gráfico 1 -	Frequência do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 .	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudos sobre o papel do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 na hepatite C crônica	21
Tabela 2 -	<i>Primers</i> utilizados no ensaio de PCR para amplificação da região do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP, com base na descrição de Dutta, 2012	31
Tabela 3 -	Protocolo do ensaio de PCR com volume final de 50 μ L para detecção genótipo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP	32
Tabela 4 -	Protocolo do ensaio de PCR com volume final de 16,7 μ L para detecção do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP	33
Tabela 5 -	Protocolo do ensaio de PCR com volume final de 16,7 μ L usando GoTaq Green Master Mix para detecção do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP	34
Tabela 6 -	Protocolo do ensaio RFLP para genotipagem do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP	36
Tabela 7 -	Características dos pacientes por tipo de estudo, retrospectivo ou prospectivo	42
Tabela 8 -	Distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3, dados demográficos e antropomórficos	43
Tabela 9 -	Distribuição dos pacientes segundo antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do vírus da hepatite C e segundo etilismo	45
Tabela 10 -	Distribuição dos pacientes segundo comorbidades	46

Tabela 11 - Distribuição dos participantes do estudo segundo exames laboratoriais selecionados	46
Tabela 12 - Distribuição dos pacientes segundo características do vírus da hepatite C	47
Tabela 13 - Distribuição dos pacientes segundo características do estudo anatomopatológico de fragmento hepático	48
Tabela 14 - Distribuição dos pacientes em relação aos dados demográficos e epidemiológicos, segundo a presença de esteatose hepática	50
Tabela 15 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose hepática	51
Tabela 16 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose hepática	52
Tabela 17 - Distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo do gene PNPLA3 e características do vírus da hepatite C, segundo presença de esteatose hepática	53
Tabela 18 - Distribuição dos pacientes em relação ao exame histopatológico de fragmento hepático, segundo presença de esteatose hepática	54
Tabela 19 - Fatores associados a esteatose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com três categorias	55
Tabela 20 - Fatores associados a esteatose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC vs CG ou GG	56
Tabela 21 - Fatores associados a esteatose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC ou CG vs GG	57
Tabela 22 - Distribuição dos pacientes em relação aos dados demográficos e epidemiológicos, segundo a presença de fibrose hepática	58
Tabela 23 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose hepática	59

Tabela 24 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de fibrose hepática	60
Tabela 25 - Distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 e características do vírus da hepatite C, segundo a presença de fibrose hepática	62
Tabela 26 - Distribuição dos pacientes em relação ao exame histopatológico de fragmento hepático, segundo presença de fibrose hepática	63
Tabela 27 - Fatores associados a fibrose hepática, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com três categorias	64
Tabela 28 - Fatores associados a fibrose hepática, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC vs CG ou GG	65
Tabela 29 - Fatores associados a fibrose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC ou CG vs GG	66
Tabela 30 - Estudos que associaram a esteatose com o polimorfismo rs738409 de acordo com o modelo recessivo	69

RESUMO

Manchiero C. Impacto da expressão do gene PNPLA3 na esteatose hepática em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: O vírus da hepatite C (HCV) possui distribuição mundial, ocorrendo em indivíduos de todas as idades e etnias. Cerca de 80% dos casos de hepatite C aguda progridem para infecção crônica e 10-20% desses casos desenvolverão complicações de doença hepática crônica, como cirrose hepática, dentro de duas a três décadas e 1-5% vão desenvolver câncer de fígado. Estudos indicam que o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 pode estar relacionado ao desenvolvimento da esteatose hepática e à progressão da fibrose. O presente estudo avaliou a associação entre o polimorfismo rs738409 presente no gene da PNPLA3 e presença de esteatose e o grau de fibrose em pacientes com hepatite C crônica. **Métodos:** Foram selecionados 314 pacientes com hepatite C crônica atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foi realizada a genotipagem do polimorfismo rs738409 (I149M) do gene PNPLA3, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase – análise de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). **Resultados:** Dos pacientes incluídos no estudo, 133 (45,9%) apresentaram o genótipo CC, 63 (21,7%) o genótipo CG e 94 (32,4%) o genótipo GG. Idade, infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3, moderada ou alta atividade inflamatória (A2-A3), IMC elevado, nível elevado de GGT e presença do alelo G (GG ou GC) mantiveram-se associados à esteatose hepática na análise multivariada. Permaneceram associados à fibrose avançada: idade, sexo masculino, níveis elevados de AST e GGT, moderada ou alta atividade inflamatória (A2-A3) e presença de esteatose hepática (>5%) na análise multivariada. **Conclusões:** Observou-se associação entre o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 e esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica, mas essa associação não foi encontrada com fibrose avançada.

Descritores: Hepatite C; Cirrose hepática; Fígado gorduroso; Fibrose; Polimorfismo de nucleotídeo único; Hepacivirus.

ABSTRACT

Manchiero C. Impact of PNPLA3 gene expression in hepatic steatosis in patients infected with hepatitis C virus [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: The hepatitis C virus (HCV) has a worldwide distribution, occurring in individuals of all ages and ethnicities. About 80% of acute hepatitis C cases progress to chronic infection and 10-20% of these cases will develop the complications of chronic liver disease such as liver cirrhosis, within 2 to 3 decades, and 1-5% will develop liver cancer. Studies indicate that the rs738409 polymorphism of the PNPLA3 gene may be related to the development of hepatic steatosis and fibrosis progression. The present study evaluated the association between the rs738409 polymorphism present in the PNPLA3 gene and the presence of steatosis and the degree of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Methods:** Three hundred and fourteen patients with chronic hepatitis C assisted at the Clinical Hospital of the Medical School of the University of São Paulo were selected. Genotyping for the PNPLA3 rs738409 (I149M) polymorphism was performed by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay (PCR-RFLP). **Results:** Of the patients included in the study, 133 (45.9%) had the CC genotype, 63 (21.7%) the CG genotype and 94 (32.4%) the GG genotype. The multivariate analysis showed an association between hepatic steatosis and age, infection with hepatitis C genotype 3, moderate or high inflammatory activity (A2-A3), high BMI, high level of GGT and presence of the G allele (GG or GC). Furthermore, multivariate analysis also showed an association between advanced fibrosis and male gender, high levels of AST and GGT, moderate or high inflammatory activity (A2-A3) and the presence of hepatic steatosis (> 5%). **Conclusions:** It was observed an association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C but this association was not found with advanced fibrosis.

Descriptors: Hepatitis C; Liver cirrhosis; Fatty liver; Fibrosis; Polymorphism, single nucleotide; Hepacivirus.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecção pelo vírus da hepatite C

A hepatite C é um importante problema para a saúde pública mundial e uma das principais causas de doença hepática crônica, a qual continua a desafiar os cientistas (Shepard et al., 2005; Cuevas et al., 2009). Caracterizada por uma inflamação do fígado causada pelo vírus da hepatite C (HCV), pode evoluir para fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Strauss, 2003; Shepard et al., 2005; Kawai et al., 2009). A hepatite C é uma das principais causas de transplante hepático em países desenvolvidos (Shepard et al., 2005).

1.1.1 Agente etiológico

O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado por Choo et al. em 1989 como a maior causa de transmissão de hepatite não-A e não-B (Choo et al., 1989).

É um vírus envelopado, classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, da família *Flaviviridae*, com diâmetro que varia de 55 a 65nm. O genoma viral é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 9400 nucleotídeos. Nesta sequência encontra-se uma região que possui uma única fase aberta de leitura (ORF) que compreende quase todo o genoma e que codifica uma poliproteína de pouco mais de 3000

aminoácidos e a presença de regiões não traduzidas (UTR- *untranslated region*) nas extremidades 5' e 3' conhecidas como regiões não codificantes (NCR-*non coding region*) (Pawlotsky, 2004; Penin et al., 2004; Campioto et al., 2005; Cuevas et al., 2009; Tang e Gris , 2009).

A região 5' NCR   altamente conservada e apresenta importante papel na tradu o do RNA viral e a região 3' NCR na inicia o da replica o do genoma viral. A ORF codifica a poliproteína precursora, que   clivada por proteases celulares e virais que são estruturalmente divididas em proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais compreendem as proteínas p7, o *core* e as glicoproteínas do envelope viral E1 e E2. Já as proteínas não estruturais são representadas por NS2, NS3, NS4 e NS5. As proteínas não estruturais são responsáveis pela replica o viral (Strauss, 2001; Penin et al., 2004; Brass et al., 2006; Tang e Gris , 2009).

1.1.2 Genótipos HCV

Desde a descoberta e clonagem do vírus C em 1989, considerável diversidade de sequência foi encontrada entre indivíduos diferentes (Simmonds et al., 1994).

Depois de levantamento por grupos de todo o mundo, essas varia es foram designadas como genótipos e subtipos. Isso permitiu a classifica o de seis genótipos distintos, enumerados de 1 a 6. Esses genótipos por sua vez compreendem um número de subtipos mais estreitamente relacionados. Os subtipos são identificados por letras. (Zein, 2000; Simmonds et al., 2005).

1.1.3 Epidemiologia

1.1.3.1 Distribuição geográfica do vírus da hepatite C e dos seus genótipos

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, estima-se que cerca de 130-150 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C e em risco de desenvolver cirrose hepática e/ou câncer de fígado, com maior prevalência da infecção pelo HCV na África e Ásia. Mais de 350 mil pessoas morrem de doenças hepáticas relacionadas com a hepatite C a cada ano (Lavanchy, 2009; Lavanchy, 2011; WHO, 2014).

No Brasil, foi realizado um estudo transversal de 2005 a 2009 com 19.503 habitantes de todas as 5 macrorregiões brasileiras, com idade entre 10 a 69 anos para estimar a soroprevalência de anticorpos contra o HCV. Os anticorpos da hepatite C foram detectados por teste de Elisa 3^o geração. Esse estudo mostrou 1,38% de positividade para HCV, estimando que 1,3 milhões de brasileiros apresentam anticorpo anti-HCV positivo (Pereira et al., 2013).

Embora os genótipos 1, 2 e 3 tenham distribuição mundial, a prevalência varia de uma área geográfica para outra (Zein, 2000). Um estudo realizado por Messina et al. em 2015 mostrou maior prevalência do genótipo 1 nos países das Américas, Europa, Oceania, leste asiático e Ásia central. Observou-se que o genótipo 2 é predominante na África Ocidental, genótipo 3 no sul da Ásia e em partes da Escandinávia, o genótipo 4 no Centro e Norte da África, genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 no sudeste da Ásia.

Focaccia et al. (2004) realizaram uma análise retrospectiva dos dados de distribuição dos genótipos do HCV de pacientes com hepatite C crônica tratados em centros de referência públicos e privados no Brasil e observaram uma prevalência de 64% para o genótipo 1, 3% para o genótipo 2 e 33% para o genótipo 3.

1.1.3.2 Transmissão

A infecção pelo HCV pode ser transmitida através do sangue e secreções contaminadas. As vias de transmissão mais associadas à infecção pelo HCV são transfusão de sangue e o uso de drogas endovenosas (WHO, 2014).

Em países desenvolvidos, a transfusão de sangue era o maior fator de risco para a aquisição da hepatite não-A não-B. A partir de 1992, com o surgimento de medidas de triagem do sangue de doadores, diminuiu de maneira considerável o risco de infecção associada à transfusão (Lauer e Walker, 2001).

O uso de drogas injetáveis é responsável por grande parte das infecções pelo HCV. A partir de 1992, houve um aumento no número de infecções por HCV associadas ao uso de drogas injetáveis, correspondendo a cerca de 2/3 das infecções (Memon e Memon, 2002).

Podem ainda ser consideradas como formas de exposição ao vírus o uso de drogas por via inalatória e outros modos de transmissão pelo sangue, tais como receptores de órgão, exposição ocupacional, hemodiálise, contato familiar, tatuagem e piercing (Memon e Memon, 2002). Transmissão sexual e

transmissão perinatal podem ocorrer, contudo é menos frequente quando comparadas às outras vias de transmissão (Lauer e Walker, 2001).

1.1.4 História Natural

A infecção crônica pelo HCV evolui lentamente, costuma ter curso heterogeneo e geralmente assintomático. Cerca de 15% dos pacientes com HCV eliminam o vírus espontaneamente após a infecção aguda, sendo que 85% desses pacientes evoluem para doença crônica (Seeff, 1997).

A progressão da hepatite C aguda para hepatite C crônica tradicionalmente é definida pela persistência do RNA (ácido ribonucléico) do vírus da hepatite C no sangue por mais de seis meses após o início da infecção. As taxas de progressão da fibrose são extremamente variáveis e acredita-se que a doença possa ser determinada pela interação complexa entre o vírus e o hospedeiro (Westbrook e Dusheiko, 2014).

A cronicidade pode levar a formas mais graves da doença. O item de preocupação é a ocorrência da cirrose em aproximadamente 5% a 25% dos infectados após 10 a 20 anos e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em cerca de 1% a 5% dos pacientes com cirrose associada ao HCV. (Thomas et al., 2000; Seeff, 2002; Thomas e Seeff, 2005).

Existem três padrões de progressão para cirrose: os de rápida progressão (cirrose em menos de 20 anos após a infecção), os de progressão intermediária (cirrose após 20 a 50 anos pós-infecção) e os de progressão lenta (cirrose após 50 anos de infecção) (Ascione et al., 2007).

Os fatores virais conhecidos até agora e que têm sido associados a progressão da hepatite C crônica são:

- Genótipos do vírus da hepatite C
- Alta diversidade genética
- Carga viral elevada

Os fatores do hospedeiro que são conhecidos até o momento e que têm sido associados a progressão para hepatite C crônica são:

- Gênero Masculino
- Idade avançada no momento da infecção
- Coinfecção com o HIV
- Imunossupressão
- Consumo de álcool em excesso
- Obesidade
- Resistência à insulina
- Presença de esteatose hepática.

1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HCV são baseados em testes de laboratório caracterizados em duas categorias: os testes indiretos (sorológico) baseados na sorologia para detectar anticorpo específico para o HCV (anti-HCV) e os testes diretos (biologia molecular) que podem detectar, quantificar ou caracterizar partículas virais do HCV.

Os principais testes utilizados para detecção dos anticorpos anti-HCV são os ensaios imunoenzimáticos (EIA ou Elisa). Eles são utilizados para

rastrear casos de infecção pelo HCV e apresentam vantagens, como facilidade de uso e baixo custo (Pawlotsky, 1998; Cavalheiro, 2010; Alter et al., 2003).

As técnicas de biologia molecular para a detecção direta do RNA do HCV têm importante papel no diagnóstico e monitoramento do tratamento da hepatite C. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é um dos testes de biologia molecular mais utilizado, que amplifica parte do genoma do vírus. São usados na detecção e quantificação do HCV (Saldanha et al., 1999; Cavalheiro, 2010).

A genotipagem do vírus da hepatite C é um importante teste para tomada de decisão terapêutica e para determinar a duração ideal da terapia, quando o tratamento é indicado. Pode ser realizada através da técnica de hibridização reversa ou análise de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (Stuyver et al., 1996; Germer et al., 1999)

1.1.6 Tratamento

O tratamento dos pacientes com infecção pelo HCV visa reduzir a progressão da doença, prevenir as complicações causadas pela cirrose e reduzir o risco de carcinoma hepatocelular.

Durante a última década, o tratamento padrão para hepatite C baseava-se na combinação de Interferon Alfa Peguilado e Ribavirina; no entanto, a taxa de resposta virológica sustentada (RVS) era baixa e com eventos adversos consideráveis (Fried et al., 2002; McHutchison et al., 2009) .

Os novos antivirais de ação direta (DAA) representam um avanço na terapia contra o vírus da hepatite C. As novas opções apresentam vantagens

como tratamento por menor período de tempo, com menos eventos adversos e maiores taxas de resposta virológica sustentada do que as modalidades de tratamento anteriormente indicadas (Manns et al., 2014; Brasil, 2015; Morio et al., 2016).

No Brasil, adicionou-se ao arsenal terapêutico do Sistema Único de Saúde (SUS) o sofosbuvir, um análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase do HCV, o simeprevir, um inibidor de protease de segunda geração, e o daclatasvir, um inibidor da NS5A. Essas medicações atuam diretamente no HCV, interrompendo a sua replicação, e constituem avanços recentes no tratamento da hepatite C crônica (Brasil, 2015).

1.2 Esteatose hepática

A esteatose hepática é definida como o acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos (Adinolfi et al., 2001; Westin et al., 2002). Ela acomete desde indivíduos sem nenhuma condição hepática estabelecida, até aqueles com doença hepática associada ao HCV ou ao alcoolismo (Brunt et al., 2003).

A esteatose pode progredir para esteato-hepatite, fibrose e cirrose em alguns doentes. É um importante determinante da resistência à insulina e é considerada como uma manifestação da síndrome metabólica hepática (Adams et al., 2005; Farrell e Larter 2006; Juurinen et al., 2007).

Estudos utilizando ressonância magnética estimaram que a prevalência da esteatose hepática é de 35% na população geral e de 75% em pessoas obesas (Bellentani et al., 2000; Browning et al., 2004). Nos Estados Unidos

(EUA) ela ocorre em aproximadamente 30% da população geral e 90% da população com obesidade (Browning et al., 2004; Szczepaniak et al., 2005).

1.3 Esteatohepatite não alcoólica (NASH)

Esteatohepatite não alcoólica (NASH) é uma doença hepática crônica que está ganhando maior importância devido ao seu potencial de progressão para formas mais graves como cirrose (Mateonni et al., 1999; Bugianesi et al., 2002).

NASH é um processo importante no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica e é uma etapa fundamental na transição da esteatose para doenças hepáticas mais graves, como a fibrose hepática, cirrose e carcinoma (Loomba e Sanyal, 2013; Xia J et al., 2016)

A esteatohepatite está estreitamente relacionada com a resistência à insulina, obesidade, hiperlipidemia, síndrome metabólica e aterosclerose. O mecanismo da progressão da NASH não é bem compreendido, mas sabe-se que o estresse oxidativo e citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na patogênese e no desenvolvimento de NASH, que conduz à passagem de esteatose para condições mais graves, tais como fibrose e carcinoma hepatocelular (Marra et al., 2008).

1.4 Doença hepática gordurosa não alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) apresenta distribuição universal e é a doença de fígado mais comum no mundo ocidental.

A DHGNA é definida como o acúmulo de gordura no fígado, na ausência de excesso de consumo de álcool e de qualquer causa secundária. Embora inicialmente benigna, a doença pode progredir lentamente de esteatose não alcoólica (NAS) para esteatohepatite não alcoólica (NASH) e, subsequentemente, para fibrose hepática, cirrose do fígado e carcinoma hepatocelular (Dongiovanni et al., 2013).

O limiar para o consumo de álcool que pode distinguir de forma confiável DHGNA de doença hepática gordurosa alcóolica (DHGA) ainda é controversa, mas a maioria dos estudos atuais usa o ponto de corte de 70 g/semana para mulheres e 140 g/semana para homens, equivalente a 20-30 g de álcool por dia. A histologia hepática varia de esteatose simples (>5% de infiltração de gordura, com/sem inflamação mínima) para esteatohepatite (NASH), que é caracterizada pela lesão de hepatócitos, inflamação e/ou fibrose e cirrose.

A prevalência de DHGNA varia de acordo com a população estudada e com os critérios de diagnóstico utilizados. Estudos baseados em ultrassonografia encontraram uma aparente prevalência da esteatose hepática em adultos saudáveis de 25-30% nos EUA e na Itália e de 29% no Japão (Marchesini et al., 2001; Browning et al., 2004; Yuan et al., 2008). Usando espectroscopia de prótons por ressonância magnética, o método não invasivo mais preciso para detectar gordura hepática, o Dallas Heart Study revelou que cerca de 30% da população dos EUA apresenta aumento do conteúdo de triglicerídeos hepáticos, embora com aminotransferases normais em 80% dos casos. Os dados de imagem estão em consonância com a prevalência estimada DHGNA por biópsia hepática ou estudos de autópsia (Bugianesi et

al., 2002; Kleiner et al., 2005; Bugianesi et al., 2005; Yamaguchi et al., 2007; Musso et al., 2011).

A DHGNA está associada a uma mortalidade global significativamente maior em comparação com a população em geral, especialmente de causas vasculares e de complicações relacionadas ao fígado. Em um estudo de base comunitária de 420 pacientes dos EUA, os pacientes com DHGNA apresentaram risco aumentado de morte em geral (razão de mortalidade padronizada: 1,34; IC 95%: 1,003-1,76) (Willner et al., 2001). Apenas 21 (5%) pacientes foram diagnosticados com cirrose, e 13 (3,1%) desenvolveram complicações relacionadas ao fígado, incluindo um com necessidade de transplante e de dois que desenvolveram carcinoma hepatocelular. Mortalidade elevada foi associada com a idade (taxa de risco por década: 2,2; IC 95%: 1,7-2,7), intolerância à glicose (*hazard ratio*: 2,6; IC 95%: 1,3-5,2), e cirrose (*hazard ratio*: 3,1; IC 95%: 1,2-7,8). Em um estudo sueco com desenho semelhante, após um seguimento médio de 13,7 anos, pouco mais de 5% dos 129 pacientes com DHGNA passou a desenvolver estágio final da doença hepática, incluindo três pacientes com carcinoma hepatocelular (Makkonen et al., 2009).

Além dos efeitos sobre o fígado, a esteatose hepática também pode aumentar o risco de morbidade e mortalidade relacionadas com o diabetes mellitus (DM), doença coronariana e outros efeitos vasculares. Em uma revisão sistemática e metanálise de 21 estudos populacionais prospectivos em diferentes grupos étnicos, observou-se que a DHGNA diagnosticada por ultrassonografia e aumento de enzimas hepáticas (ALT e GGT) esteve associada a um risco aumentado de diabetes no futuro (Giudice et al., 2011). Além disso, em indivíduos com diagnóstico de DM tipo 2, a presença de

DHGNA aumenta ainda mais o risco de complicações relacionadas com o diabetes, incluindo eventos vasculares (Davis et al., 2010). DHGNA também está associada com um aumento da prevalência das doenças cardiovasculares, assim como eventos cardiovasculares não fatais e mortalidade por causa vascular (Santoro et al., 2012).

1.5 Doença hepática gordurosa não alcoólica e PNPLA3

Em 2008, dois estudos independentes de associação de genoma relacionaram o polimorfismo rs738409 do gene *Patatin like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3) ao conteúdo de gordura e aos níveis de alanina aminotransferase (ALT) (Romeo et al., 2008; Yuan et al., 2008). Os autores (Romeo et al., 2008) realizaram um estudo de associação (de genoma) de variações de sequência em uma população multiétnica. Cada variante foi testada para associação com gordura hepática em 1032 afro-americanos, 696 americanos de ascendência europeia e 383 hispânicos. Uma única variante no gene PNPLA3 (rs738409) foi fortemente associada à gordura hepática. Essa variante é constituída por uma substituição de citosina por guanina que muda o códon 148 de isoleucina para metionina. PNPLA3 codifica o aminoácido 481 de uma proteína de função pouco conhecida que pertence à família “*patatin – like phospholipase*”. A associação entre PNPLA3 – I148M e gordura hepática permaneceu significativa após ajuste por Índice de Massa Corpórea (IMC), diabetes, uso de álcool e foi significativa também nos três grupos étnicos. As frequências de PNPLA 3 – 148M foram concordantes com a prevalência relativa de DHGNA nos três grupos étnicos; a maior frequência do alelo foi

encontrada nos hispânicos (0,49), com menores frequências observadas nos americanos de origem europeia (0,23) e americanos de origem africana (0,17). Vários estudos subsequentes reproduziram a associação entre o polimorfismo I148M e DHGNA em todos os grupos étnicos, tanto em adultos como em crianças (Kotronen et al., 2009; Sookoian et al., 2009; Rotman et al., 2010; Speliotes et al., 2010; Hotta et al., 2010).

Em estudo de metanálise, Sookoian et al. (2011) observaram associação entre gordura hepática e a variante rs738409 (a homozigose GG mostrou conteúdo lipídico 73% maior quando comparado com CC). Observou-se também que a homozigose do alelo 148M estava associado a um aumento de 3.3 vezes no risco de NASH e fibrose hepática (Valenti et al., 2010; Sookoian et al., 2009), embora não tenha sido confirmado por Rotman et al. (2010).

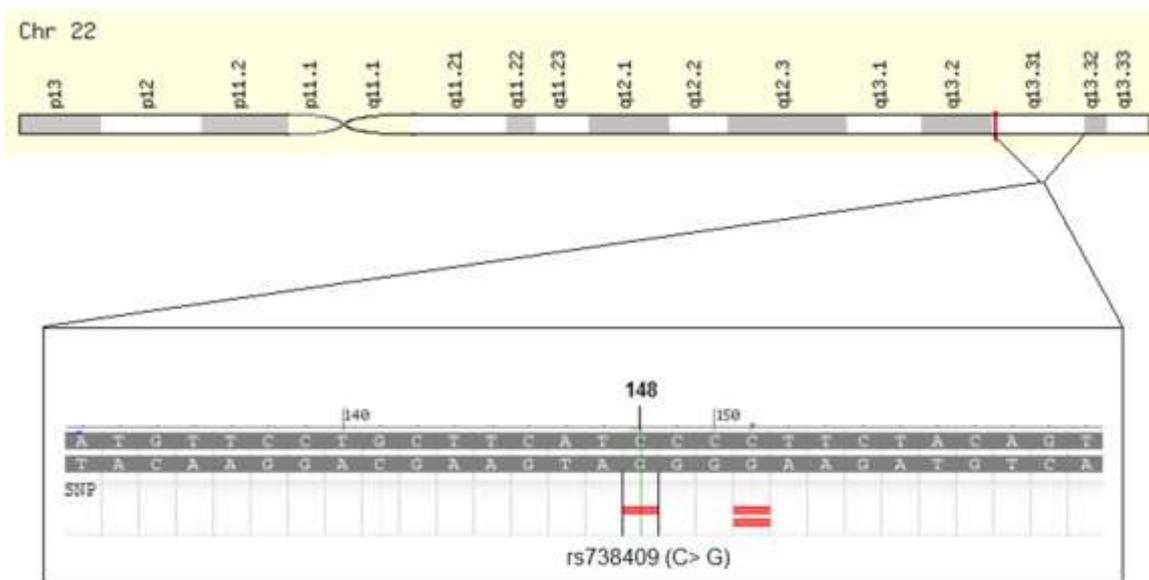
Recentes estudos associaram o polimorfismo rs738409 com a DHGNA em pacientes asiáticos (Wang et al., 2016; Xia MF et al., 2016).

1.6 Gene PNPLA3

O gene PNPLA3, pertencente à família patatina com domínio fosfolipase, e alternativamente referido como adiponutrin, é uma proteína da transmembrana expressa no fígado com atividade de fosfolipase e transacetilase, que codifica uma proteína de 481 aminoácidos. O progenitor da família, a patatina, é uma grande proteína de tubérculos da batateira e tem atividade lipídica inespecífica (He et al., 2010; Kollerits et al., 2012). A expressão do gene PNPLA3 é regulada durante o jejum e é induzida durante a

alta ingestão calórica, pois a atividade do gene é regulada em resposta à glicose, insulina, e hormônios da tireóide.

Foi identificado um polimorfismo no gene da PNPLA3 no cromossomo 22, o SNP rs738409 (C/G), caracterizado pela substituição da isoleucina por metionina na posição do aminoácido 148 (I148M), que está fortemente associado com o conteúdo de gordura hepática e com elevados níveis séricos de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, que são marcadores da ocorrência de necrose no fígado (**Figura 1**) (Santoro et al., 2010).



FONTE: www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PNPLA3

Figura 1 - Localização do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 no cromossomo 22

O tipo selvagem do PNPLA3 (148I) apresenta atividade lipolítica sobre triglicérides. A mutação 148M (substituição da isoleucina pela metionina na posição 148) determina a substituição de um aminoácido próximo ao domínio catalítico, reduzindo provavelmente o acesso de substratos e reduzindo a atividade enzimática do PNPLA3 sobre glicerolípides, levando ao

desenvolvimento de esteatose macrovascular (He et al., 2010; Pirazzi et al., 2012). Entretanto, outros estudos mostraram um ganho de função lipogênica associada à variante 148M, que passaria a ter a habilidade de sintetizar ácido fosfatídico a partir de ácido lisofosfatídico (Kumari et al., 2012).

Tomado em conjunto, estes estudos suportam o conceito de que as diferenças de sequência no gene da PNPLA3 conduzem ao depósito de gordura e inflamação no fígado. O mecanismo pelo qual a variação de PNPLA3 afeta o fígado não é conhecido (Santoro et al., 2010; He et al., 2010).

1.7 Hepatite C crônica e esteatose

A esteatose hepática é um achado bastante comum nos estudos de fragmento hepático de pacientes com HCV, presente em aproximadamente 50% desses pacientes (Scheuer et al., 1992; Bach et al., 1992). Ela é caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos nas células do fígado e o diagnóstico é feito em geral por avaliação histológica de fragmento hepático e da quantificação de gordura nas células hepáticas (Kleiner et al., 2005). A importância da esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica é reconhecida atualmente devido, principalmente, ao impacto negativo sobre a história natural da infecção pelo vírus da hepatite C (Fartoux et al., 2005; Leandro et al., 2006) e por influenciar negativamente a resposta ao tratamento com peginterferon e ribavirina (Kau et al., 2008).

A presença de esteatose tem sido associada a características histológicas mais agressivas, provavelmente porque a esteatose hepática

favorece o ciclo de vida do vírus da hepatite C. Acredita-se que fatores virais e do hospedeiro possam contribuir para a sua patogênese.

Em pacientes portadores do HCV, o desenvolvimento da esteatose tem sido associado a uma série de fatores, incluindo elevado índice de massa corpórea, resistência à insulina e idade avançada. Evidências também indicam que a esteatose contribui para progressão da fibrose (Adinolfi et al., 2001; Patton et al. 2004). Obesidade, diabetes, consumo de álcool e polimorfismos genéticos nos genes PNPLA3, IL28B e MBOAT2 também são fatores que interferem na progressão da esteatose (Leandro et al. 2006; Westin et al., 2007; Cai et al., 2011).

Fatores virais, em especial o genótipo 3 do vírus da hepatite C, estão associados à esteatose mais prevalente e mais severa (Rubbia-Brandt et al., 2004; Patton et al., 2004).

1.8 Hepatite C e fibrose

A fibrose hepática é a principal complicação da hepatite C. A progressão da fibrose eleva a mortalidade da doença, podendo evoluir para óbito em decorrência das complicações da cirrose ou carcinoma hepatocelular. Quase um terço dos doentes com hepatite C crônica com cirrose hepática e 12% com fibrose avançada evoluíram para a descompensação dentro de 5 anos. Dentre os indivíduos com fibrose avançada (F3), 5% desenvolveu carcinoma hepatocelular, 2% foi submetido a transplante de fígado e 11% morreu devido a qualquer outra causa (Moorman et al., 2014).

Poynard et al. (1997) associaram idade avançada no momento da infecção, duração da infecção, consumo de álcool e sexo masculino com a progressão da fibrose.

Castéra et al. (2003) associaram a progressão da fibrose ao sexo masculino ($p=0,05$), atividade histológica ($p=0,04$) e esteatose ($p=0,0003$). Na análise multivariada, o único fator independentemente associado com a progressão da fibrose foi a esteatose (IC 95%: 1,3-10,8; $p=0,0001$).

Outros estudos observaram que a pacientes com infecção pelo HCV genótipo 3, IMC elevado, diabetes, HOMA, presença de polimorfismo como o rs738409 do gene da PNPLA3 e aumento das enzimas hepáticas podem ser fatores determinantes da progressão da fibrose (Hui et al., 2003; Boccatto et al., 2006; Valenti et al., 2011; Baran et al., 2014; Huang et al., 2014).

1.9 Hepatite C crônica, esteatose, fibrose e PNPLA3

Cai et al. (2011) analisaram o papel dos SNPs de 19 genes candidatos (sistematicamente selecionados) na esteatose hepática em 626 pacientes caucasianos infectados pelo HCV. Os autores observaram que o risco de esteatose foi maior na presença de polimorfismo do gene PNPLA3, mas apenas em pacientes com infecção pelo HCV genótipos não-3 (*odds ratio* [OR]: 1,9; intervalo de confiança de 95% [IC]: 1,6-2,3; $p<0,001$).

No estudo feito por Valenti et al. (2011) em uma coorte de 325 pacientes italianos, o genótipo GG de rs738409, observado em 10% dos pacientes, foi associado à esteatose independentemente da idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), diabetes, consumo de álcool e genótipo viral. O genótipo GG

esteve associado ao grau de fibrose e cirrose (OR: 1,47; IC 95%: 1,2-1,9; $p < 0,002$), à resposta ao tratamento (OR: 0,63; IC 95%: 0,4-0,8; $p < 0,006$) e à ocorrência de HCC (OR: 2,16; IC 95%: 1,3-3,6; $p < 0,002$).

Trepó et al. (2011) estudaram uma coorte de 537 pacientes de três centros europeus (Bruxelas, Hannover e Lyon), para avaliar o impacto do SNP rs738409 na esteatose e na progressão da fibrose em pacientes com hepatite C crônica. Portadores homozigotos do alelo G mantiveram-se em maior risco de esteatose ($p < 0,034$), de fibrose ($p < 0,002$) e de progressão da fibrose ($p < 0,013$). Observaram também que o SNP rs738409 não esteve associado à falha do tratamento antiviral. A distribuição da frequência do alelo G também esteve significativamente associada à esteatose ($p = 0,038$) e conferiu um maior risco aos homozigotos do alelo G ($p = 0,012$) do que para os portadores do alelo G heterozigotos ($p = 0,199$). O genótipo GG mostrou-se preditor de fibrose, de progressão da fibrose e de esteatose.

Yasui et al. (2015) analisaram 276 pacientes japoneses com hepatite C e virgens de tratamento. Observaram que o genótipo GG rs738409 foi independentemente associado com a presença de esteatose (OR: 2,58; IC 95%: 1,37-4,84, $p = 0,003$), atividade necro-inflamatória grave (OR: 2,16; IC 95%: 1,12-4,16; $p = 0,02$) e fibrose avançada (OR: 2,10; IC 95%: 1,07-4,11; $p = 0,03$), obtendo resultados similares aos estudos europeus.

Huang et al. (2014) realizaram um estudo com 1077 pacientes asiáticos e relataram que pacientes com fibrose hepática avançada apresentaram maiores proporções do genótipo CG/GG (OR: 1,34; IC 95%: 1,006-1,785, $p = 0,046$). O gene PNPLA3 mostrou-se um importante fator preditivo de fibrose em pacientes diabéticos, usando o modelo recessivo (OR: 4,53; IC 95%: 1,356-

15,106; $p=0,014$) ou o modelo dominante (OR: 2,20; IC 95%: 1,026-4,734; $p=0,04$).

Apuero et al. (2014) analisaram 474 pacientes com infecção pelo HCV tratados com interferon- α , com o objetivo de avaliar o impacto do alelo G do polimorfismo rs738409 na esteatose hepática. O alelo G foi associado com a esteatose hepática ($p<0,0001$), particularmente em pacientes com infecção pelo HCV genótipo 1 ($p=0,001$) e com IL28B genótipo CT/TT ($p=0,0001$), mas não foi associada a RVS.

Rueger et al. (2015) realizaram um estudo com 1461 pacientes com hepatite C crônica, para avaliar o impacto de alguns fatores de risco, como o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3, na progressão da doença. O polimorfismo da PNPLA3 foi associado com a progressão da fibrose. Tamaki et al. (2015) também associaram o polimorfismo rs738409 com a progressão rápida da fibrose nos 176 pacientes avaliados em sua investigação.

No entanto, em outro estudo de pacientes com hepatite C (Zampino et al., 2013), os autores encontraram associação entre polimorfismo do gene PNPLA3 e esteatose hepática, mas não com progressão de fibrose. Além disso, outro estudo feito por Nakamura et al. (2013) com 206 pacientes de um hospital universitário do Japão não encontrou associação do polimorfismo da IL28B e PNPLA3 com esteatose e cirrose hepática nesses portadores de hepatite C.

Estudos mais recentes estão investigando a associação entre o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 e carcinoma hepatocelular em pacientes com hepatite C. No Japão, um estudo com 231 pacientes

demonstrou que esse polimorfismo foi associado com a progressão de fibrose e cirrose, contribuindo para o desenvolvimento de HCC (Nakaoka et al., 2015).

Ali et al. (2016) encontraram associação do rs738409 com a presença de cirrose (OR: 1,76; IC 95%: 1,34-2,30). Na análise multivariada, a progressão da fibrose estava associada com a obesidade (OR: 1,67; IC 95%: 1,11-2,51) e o genótipo CG/GG da PNPLA3 (OR: 1,70; IC 95%: 1,13-2,56). O polimorfismo rs738409 não estava associada com o desenvolvimento de HCC ($p=0,85$).

A descrição de alguns estudos que associaram o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 com a esteatose, fibrose hepática e outros eventos em pacientes com hepatite C é mostrada na **Tabela 1**.

Vários estudos sugerem que a esteatose hepática é fator de risco associado à progressão da fibrose e também à baixa resposta virológica sustentada ao tratamento padrão da hepatite C com peginterferon e ribavirina. Se a predisposição à esteatose hepática é conhecida com antecedência, estratégias para a não progressão da fibrose podem ter efeito benéfico, incluindo tratamento antiviral específico, independente do grau de fibrose inicial.

Tabela 1 - Estudos sobre o papel do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 na hepatite C crônica

Referência	Nº de pacientes	rs738409 PNPLA3				
		Esteatose	Fibrose	Cirrose	RVS	HCC
Cai et al., 2011	626	p<0,001	-	-	-	-
Valenti et al., 2011	325	-	p <0,002	p <0,002	p <0,006	p <0,002
Trepó et al., 2011	537	p<0,034	p <0,002	-	-	-
Zampino et al., 2013	166	p=0,0047	Não associada	-	-	-
Nakamura et al., 2013	206	Não associada	-	Não associada	-	-
Yasui et al., 2015	276	p <0,003	p <0,03	-	-	-
Huang et al., 2014	1077	-	p= 0,046	-	-	-
Apuero et al., 2015	474	p<0,0001	-	-	-	-
Nakaoka et al., 2015	231	-	-	p = 0,0599	-	p=0,0218
Tamaki et al., 2015	176	-	p=0,005	-	-	-
Ali et al., 2016	937	p<0,001	-	-	-	Não associado

RVS: Resposta Viroológica Sustentada; HCC: Carcinoma Hepatocelular

2 OBJETIVOS

Avaliar a associação entre o polimorfismo rs738409 presente no gene da PNPLA3 e a presença de esteatose e o grau de fibrose em pacientes com hepatite C crônica, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, São Paulo.

3 MÉTODOS

Trata-se de um estudo realizado com pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e que apresenta componente retrospectivo e prospectivo.

O Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP iniciou seu funcionamento em 1987, sob a coordenação do Professor Antonio Alci Barone, oferecendo infraestrutura mais adequada para o atendimento de pacientes com hepatites virais. O ambulatório de hepatites é, atualmente, um dos serviços de referência para atendimento de Hepatites Virais da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, dividindo, em parte, essa função com a Divisão de Gastroenterologia Clínica do HC-FMUSP.

3.1 Casuística

Para uma melhor compreensão da inclusão dos pacientes neste estudo, este item foi subdividido como se segue:

Parte 1. Componente retrospectivo

Parte 2. Componente prospectivo

Parte 3. Estudo realizado

Parte 1. Componente retrospectivo

O presente estudo utilizou dados que foram coletados para um projeto de pesquisa mais amplo, denominado *Manifestações Extra-Hepáticas da Hepatite C – estudo transversal (Anexo 1)*, cujo objetivo principal foi o de avaliar a presença de manifestações extra-hepáticas, clínicas e laboratoriais, em pacientes com hepatite C crônica, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, na cidade de São Paulo, no período compreendido entre janeiro de 2010 a dezembro de 2012. Os critérios de inclusão utilizados foram: (a) Paciente atendido no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP; (b) Idade: ≥ 18 anos (c) Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), definida pela presença de RNA-HCV e (d) Estudo anatomopatológico de fragmento hepático, realizado nos últimos 3 anos. Os critérios de exclusão utilizados foram: (a) Infecção por vírus da hepatite B (HBV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) e (b) Condições hepáticas de outras etiologias, incluindo Doença de Wilson, cirrose biliar primária e doença hepática autoimune.

O estudo foi realizado através de entrevista, utilizando um impresso padronizado (**Anexo 2**), consulta médica, exames de sangue e urina e a coleta de 10 ml de sangue para a realização de exames de biologia molecular. A coleta de dados foi feita no período de 2010 a 2012.

Foram incluídos 238 pacientes.

Parte 2. Componente prospectivo

Nesta fase, os participantes foram incluídos, utilizando como critérios de inclusão: (a) Paciente atendido no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, na cidade de São Paulo; (b) Idade: ≥ 18 anos; (c) Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), definida pela presença de RNA-HCV e (d) Pacientes sem tratamento prévio específico para hepatite C. Os critérios de exclusão utilizados foram: (a) Infecção por HBV e HIV e (b) Condições hepáticas de outras etiologias, incluindo Doença de Wilson, cirrose biliar primária e doença hepática autoimune.

O estudo foi realizado através de entrevista, utilizando um impresso padronizado (**Anexo 2**), consulta médica, exames de sangue e urina, avaliação anatomopatológica de fragmento hepático e a coleta de 10 ml de sangue para a realização de exames de biologia molecular. A coleta de dados foi feita no período de 2013 a 2015.

Foram incluídos 88 pacientes.

Parte 3. Estudo realizado

Dos 238 pacientes incluídos no estudo retrospectivo, selecionamos 226, cujos dados estavam completos para este estudo. Além de 226 pacientes incluídos retrospectivamente, adicionamos 88 participantes prospectivamente, totalizando 314 pacientes para o presente estudo.

Em entrevistas e consulta médica, foram investigados os itens listados a seguir:

- Dados demográficos: sexo, idade

- Dados antropomórficos: peso e altura
- Fatores de risco para aquisição do vírus da hepatite C
- Hábitos: etilismo
- Níveis séricos de HCV RNA (Log IU/ml)
- Genótipos do vírus da hepatite C
- Testes bioquímicos (soro): Glicemia, Insulina, ALT, AST, GGT, Colesterol total e frações, triglicérides, proteínas totais e frações
- Grau de resistência à insulina: através do cálculo HOMA (do inglês *homeostatic model assessment*). O cálculo é feito com base nas dosagens de glicose e insulina em jejum: $\text{glicemia jejum} \times 0,0555 \times \text{Insulina jejum} / 22,5$

O estudo anatomopatológico de fragmento hepático foi feito, segundo critérios estabelecidos pelo Consenso Nacional sobre a Classificação das Hepatites Crônicas (Gayotto, 2000) e pelo sistema Metavir (The French METAVIR Cooperative Study Group, 1994). O grau de esteatose foi avaliado, conforme descrito por Kleiner et al. (esteatose discreta, esteatose moderada e esteatose acentuada) (Kleiner et al., 2005).

Pelo Consenso Nacional sobre a Classificação das Hepatites Crônicas o tecido hepático é avaliado, através da análise da arquitetura hepática (graduada de 0 a 4), do infiltrado inflamatório em área portal (graduada de 0 a 4), da atividade inflamatória em área periportal (graduada de 0 a 4) e da atividade parenquimatosa (graduada de 0 a 4), como descrita a seguir:

Alterações Arquiteturais: 0 (arquitetura lobular normal), 1 (expansão fibrosa portal), 2 (expansão fibrosa portal com septos porta-porta), 3 (transformação nodular) e 4 (cirrose). **Infiltrado inflamatório portal/septal:** 0 (raros linfócitos

portais), 1 (aumento discreto dos linfócitos portais), 2 (aumento moderado dos linfócitos portais), 3 (aumento acentuado dos linfócitos portais) e 4 (aumento muito acentuado dos linfócitos portais). **Atividade periportal/periseptal:** 0 (ausência de lesões da interface espaço porta/parênquima), 1 (extravasamento de linfócitos para a interface *spill over* - não caracterizando a presença de necrose em saca-bocado), 2 (necrose em saca-bocado discreta), 3 (necrose em saca-bocados moderada) e 4 (necrose em saca-bocados acentuada). **Atividade Parenquimatosa:** 0 (hepatócitos normais, isomorfos), 1 (alterações discretas de hepatócitos, com raros focos de necrose), 2 (necrose focal de hepatócitos em numerosos sítios), 3 (áreas limitadas de necrose confluyente) e 4 (necrose confluyente extensa, múltipla).

Pelo sistema Metavir são avaliados o grau de fibrose e de atividade inflamatória do fígado, como se segue: **Fibrose:** F0 (ausente), F1 (Fibrose Portal sem Septos), F2 (Fibrose Portal com Raros Septos), F3 (Numerosos Septos sem Cirrose) e F4 (Cirrose). **Atividade inflamatória:** A0 (Ausente), A1 (Atividade Leve), A2 (Atividade Moderada), A3 (Atividade Intensa).

O **grau de esteatose** foi avaliado, como descrito por Kleiner et al: grau 0 (<5% dos hepatócitos), grau 1 - esteatose discreta (5 a 33% dos hepatócitos), grau 2 - esteatose moderada (34 a 66% dos hepatócitos) e grau 3 - esteatose acentuada (>66% dos hepatócitos).

3.2 Material biológico – sangue

Para a avaliação de níveis séricos de RNA-HCV, genotipagem do HCV e da presença do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 foram utilizadas

amostras de soro que estavam no LIM 47 – Laboratório de Hepatologia por Vírus (componente retrospectivo) e amostras que foram coletadas a partir de janeiro de 2013.

As amostras foram coletadas em tubo seco e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foram feitas alíquotas que foram guardadas em freezer -80°C.

A parte experimental foi conduzida no LIM 47, que está equipado para a realização de técnicas de Biologia Molecular, com salas separadas, além de equipamentos que proporcionam autonomia na realização das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de análise de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Foram respeitadas todas as normas de biossegurança e de qualidade em técnicas de biologia molecular.

3.3 Métodos laboratoriais

3.3.1 Níveis séricos de HCV-RNA

Foram avaliados com o teste *Amplicor HCV Monitor 2.0* (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante. Esse teste isola o RNA do HCV através da lise das partículas virais com um agente caotrópico, criando condições para a ligação dos ácidos nucleicos à membrana de sílica.

3.3.2 Genotipagem do vírus da hepatite C

Foi avaliado com o teste *Versant® HCV Genotype 2.0 (LiPA)* (Immunogenetics, Ghent, Bélgica), conforme instruções do fabricante. Esse procedimento é realizado em quatro atividades principais: desnaturação das amostras, hibridização das amostras, lavagem das tiras e revelação da cor.

3.3.3 Polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3

3.3.3.1 Extração e purificação do DNA

A extração e purificação do DNA (ácido desoxirribonucleico), a partir de 200 µL do soro, foi realizada utilizando o kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen – Life Technologies, Carisbad, Califórnia, EUA), que por eluição purifica o DNA de acordo com instruções do fabricante. Esse kit purifica o DNA através de membranas de sílica.

O protocolo foi realizado da seguinte forma: em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, foram adicionados 20 µL de Proteinase K, 200 µL de amostra e 20 µL de RNase A, agitando-se no vórtex por 15 segundos e incubando em temperatura ambiente por 2 minutos. Após a incubação, foi adicionado 200 µL do tampão de lise (*Lysis/Binding Buffer*) e foi realizada incubação em bloco de aquecimento à 55°C por 10 minutos. Após a incubação, proceder-se-á à centrifugação. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%) e agitado no vórtex por 15 segundos. Após esse processo, todo o conteúdo foi transferido para uma coluna com filtro, seguido

de uma centrifugação a 10.000 rotações por minutos (rpm) por 2 minutos, e em seguida a coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem (*Buffer AW1*), centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto e novamente a coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem (*Buffer AW2*), centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos. A coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL, onde foram acrescentados 50 µL do tampão de eluição (*Elution Buffer*) e incubado por 1 minuto em temperatura ambiente. Seguiu-se a centrifugação à 10.000 rpm por 1 minuto. Por fim, foram obtidos 50 µL de volume final de DNA extraído que foi estocado a -20°C.

3.3.3.2 PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - análise de tamanho de fragmentos de restrição) para o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3

Após extração do DNA as amostras foram submetidas à reação de PCR-RFLP, onde é evidenciada a fragmentação do DNA em sítios específicos, através do uso de enzimas de restrição. Os protocolos utilizados nesse estudo foram realizados com base nas descrições de Dutta, 2012. As misturas de reação para a PCR para a amplificação de um fragmento de 333 pb incluindo polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 foram adaptadas e para isso utilizamos tampão (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM), dNTPs, *primers*, DNA genômico e DNA Taq polimerase. As temperaturas de ciclagem foram ajustadas para otimizar as reações de PCR.

A **Tabela 2** mostra os *primers* utilizados para a amplificação de um fragmento de 333 pb incluindo polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3.

Tabela 2 - *Primers* utilizados no ensaio de PCR para amplificação da região do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP, com base na descrição de Dutta, 2012

Ensaio Molecular	Primer	Sequencia 5' – 3' e tamanho do produto
PCR rs738409	rs7384F (Forward)	TGGGCCTGAAGTCCGAGGGT (9906-9925, 20 pb)
	rs7384R (Reverse)	CCGACACCAGTGCCCTGCAG (10238-10219, 20 pb)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase ; pb: pares de bases. Adaptado de Dutta, 2012.

A quantidade de reagentes para o protocolo de PCR inicialmente foi padronizada para o volume final de 50 µL, conforme descrito na **Tabela 3**. Posteriormente o protocolo de PCR foi otimizado para um volume final de 16,7 µL, como mostra a **Tabela 4**, diminuindo a quantidade de reagentes utilizados na primeira padronização e ficando na quantidade ideal para a realização da técnica RFLP. Posteriormente, o protocolo sofreu troca de reagente, onde foi otimizado com o uso da *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Madison, EUA) para gerar maior estabilidade (**Tabela 5**).

Tabela 3 - Protocolo do ensaio de PCR com volume final de 50 μL para detecção genótipo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP

Condições da reação	PCR rs738409	
Reagentes		
dNTP	1 μL	
Buffer (Tris-HCL)	5 μL	
MgCl ₂	2 μL	
Primer rs7384F (Forward) 10 pmol/ μL	1,5 μL	
Primer rs7384R (Reverse) 10 pmol/ μL	1,5 μL	
H ₂ O	33,5 μL	
Taq DNA Polimerase	0,5 μL	
DNA genômico	5 μL	
Volume final	50 μL	
		94° C – 2 minutos
		94° C – 30 segundos
Condições de Ciclagem	35	66° C – 30 segundos
	ciclos	72° C – 30 segundos
		72° C – 5 minutos
		8° C – ∞

Adaptado de Dutta, 2012.

Tabela 4 - Protocolo do ensaio de PCR com volume final de 16,7 μL para detecção do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP

Condições da reação	PCR rs738409
Reagentes	
dNTP	0,4 μL
Buffer (Tris-HCL)	1,7 μL
MgCl ₂	0,7 μL
Primer rs7384F (Forward) 10 pmol/ μL	0,6 μL
Primer rs7384R (Reverse) 10 pmol/ μL	0,6 μL
H ₂ O	10,8 μL
Taq DNA Polimerase	0,2 μL
DNA genômico	1,7 μL
Volume final	16,7 μL
Condições de Ciclagem	94° C – 5 minutos 94° C – 30 segundos 35 66° C – 30 segundos ciclos 72° C – 30 segundos 72° C – 5 minutos 8° C – ∞

Adaptado de Dutta, 2012.

Tabela 5 - Protocolo do ensaio de PCR com volume final de 16,7 μL usando GoTaq Green Master Mix para detecção do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 do DNA humano de pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP

Condições da reação	PCR rs738409
Reagentes	
H ₂ O	5,3 μL
GoTaq Green Master Mix	8,3 μL
Primer rs7384F (Forward) 10 pmol/ μL	0,7 μL
Primer rs7384R (Reverse) 10 pmol/ μL	0,7 μL
DNA genômico	1,7 μL
Volume final	16,7 μL
Condições de Ciclagem	
	94° C – 5 minutos
	94° C – 30 segundos
35	66° C – 30 segundos
ciclos	72° C – 30 segundos
	72° C – 5 segundos
	8° C – ∞

Adaptado de Dutta, 2012.

Após a realização da PCR, o produto amplificado do gene PNPLA3 foi observado pela presença de uma banda de 333 pares de bases em gel de agarose a 2% (2 gramas de agarose em 100 mL de TBE (Tris-Borato EDTA - Invitrogen – Life Technologies, Carisbad, Califórnia, EUA) 1x concentrado, corado com 6 μL do *DiamondTM Nucleid Acid Dye* (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA), após corrida em uma cuba eletroforética Horizon 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Life Technologies, Carisbad, Califórnia, EUA) contendo tampão TBE (0,5x concentrado). Foram aplicados no gel 5 μL do produto amplificado mais 1 μL de Blue Juice (exceto quando usado GoTaq Green Master Mix) e 4 μL do padrão de peso molecular de DNA de 100 pares de base (DNA ladder - Invitrogen – Life Technologies, Carisbad, Califórnia, EUA). A separação eletroforética foi realizada com uma

corrente constante de 110 Volts, 400 amperes por 1 hora e 15 minutos. Logo após a eletroforese de gel de agarose, os produtos amplificados foram visualizados como bandas sob luz Ultravioleta (UV) no fotodocumentador UVIdoc HD2 (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido). As imagens foram registradas em arquivos digitais (**Figura 2**).

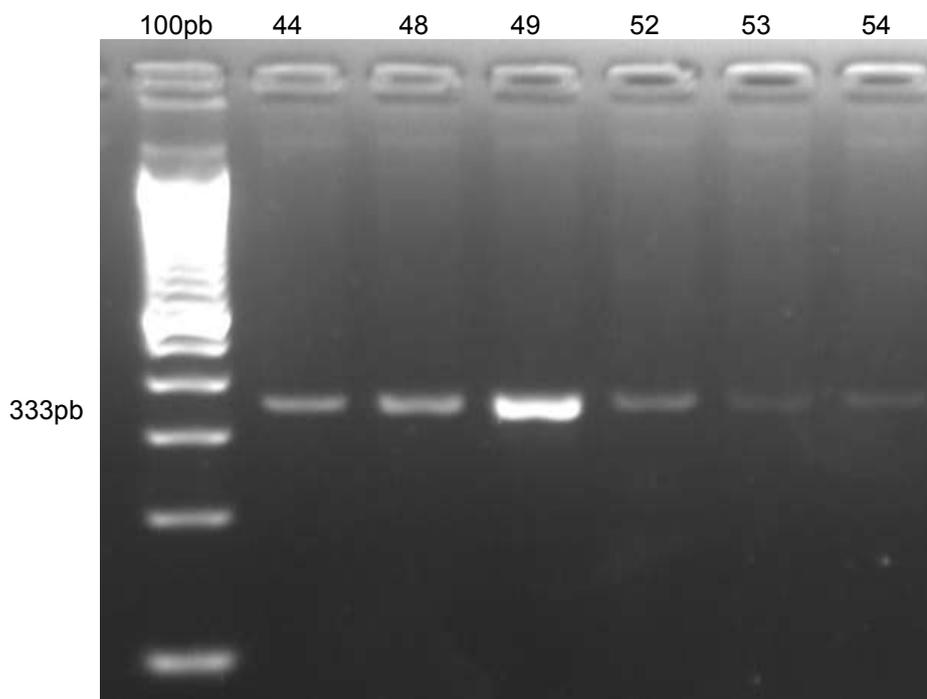


Figura 2 - Análise do produto amplificado do gene PNPLA3
pb: pares de base.

A digestão enzimática dos produtos de PCR foi realizada utilizando a técnica de RFLP. Para discriminar o genótipo do polimorfismo rs738409, o amplificado foi digerido com 4 U da enzima de restrição de endonuclease BtsCI a 50°C durante 4 horas em 15 µL de reação conforme o protocolo descrito na **Tabela 6**. A incubação da enzima foi realizada em termociclador por ser um equipamento que mantém a temperatura constante. A digestão foi interrompida incubando a 0°C.

Tabela 6 - Protocolo do ensaio RFLP para genotipagem do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 pacientes com hepatite C crônica do HC-FMUSP

Condições da reação	Digestão enzimática
Reagentes	rs738409 - PNPLA3
H ₂ O	3,1 µL
Tampão da enzima	1,5 µL
Produto amplificado (DNA)	10 µL
Enzima BtsCI (4 U)	0,4 µL
Volume final	15 µL
	50°C - 4h
Condições da Incubação	80°C - 20 min
	0°C (interromper a digestão)

Adaptado de Dutta, 2012

Os produtos da digestão com a enzima de restrição foram submetidos a gel de agarose a 2% (2 gramas de agarose em 100 mL de TBE (Invitrogen – Life Technologies, Carisbad, Califórina, EUA) 1x concentrado) corado com 6 µL do *DiamondTM Nucleid Acid Dye* (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA) corrida em uma cuba eletroforética Horizon 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Life Technologies, Carisbad, Califórina, EUA) contendo tampão TBE (0,5x concentrado). Foram aplicados no gel 15 µL do produto da digestão enzimática mais 1 µL de Blue Juice (exceto quando usado *GoTaq Green Master Mix*) e 4 µL do padrão de peso molecular de DNA de 100 pares de base (DNA ladder - Invitrogen – Life Technologies, Carisbad, Califórina, EUA). A separação eletroforética foi realizada com uma corrente constante de 110 Volts, 400 amperes por 1 hora e 15 minutos. Logo após a eletroforese em gel de agarose, os produtos amplificados foram visualizados como bandas sob luz Ultravioleta (UV) no fotodocumentador UVIdoc HD2 (Uvitec Cambridge,

Cambridge, Reino Unido). As imagens foram registradas em arquivos digitais (**Figura 3**).

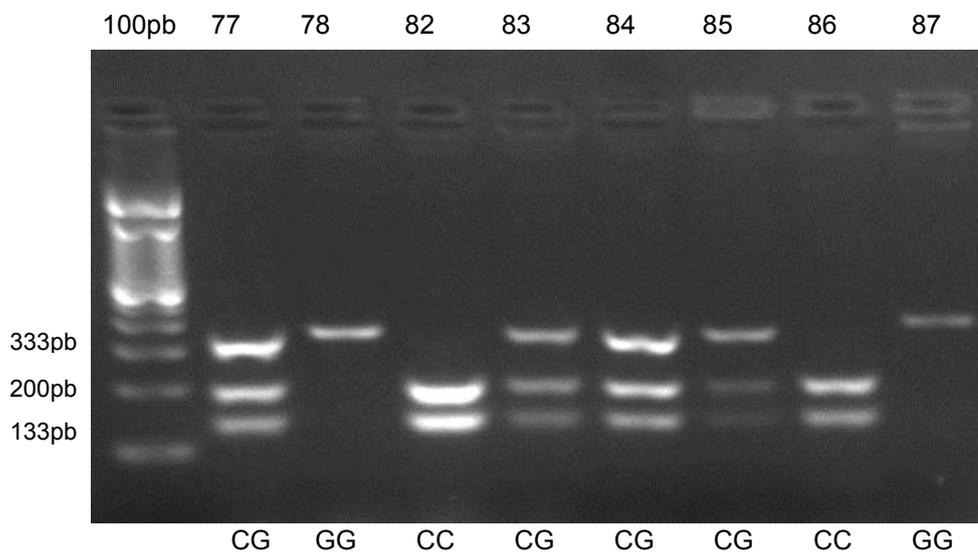


Figura 3 - Análise do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) do produto amplificado do gene PNPLA3
pb: pares de base.

A **Figura 3** representa o resultado da revelação do gel de agarose a 2% dos produtos da digestão enzimática (RFLP), onde os indivíduos 82 e 83 foram homozigotos para o alelo normal - CC (presença de dois fragmentos, um de 200 pb e outro de 133 pb); os indivíduos 77, 83, 84 e 85 foram heterozigotos - CG (alelo normal formando uma banda de 200 pb e outra de 133 pb e alelo mutado formando uma banda de 333 pb) e os indivíduos 78 e 87 foram homozigotos para o alelo mutado - GG (ambos os alelos possuem a mutação eliminando a ação da enzima de restrição formando uma banda de 333 pb).

3.4 Análise dos dados coletados

Foram descritas as características quantitativas avaliadas em todos os pacientes com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e as características qualitativas foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas. Foram descritas as frequências de esteatose e de fibrose segundo características pessoais, clínicas e laboratoriais qualitativas e foi verificada a presença de associação com uso de teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

As características quantitativas foram descritas segundo presença de esteatose e fibrose com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas entre os grupos com uso de teste t-Student (Kirkwood e Sterne, 2006). Foram estimados os *Odds Ratio* de cada variável com a ocorrência de esteatose e de fibrose com os respectivos intervalos de 95% de confiança com uso de regressão logística simples (Hosmer e Lemeshow, 2000). Para podermos comparar melhor com os dados de literatura, avaliamos também o efeito do PNPLA3 usando o modelo genético de herança recessiva (genótipo GG vs CG + CC) e dominante (genótipo CC vs CG + GG), segundo presença de esteatose e fibrose avançada.

Foram estimados modelos de regressão logística múltipla (Hosmer; Lemeshow, 2000) para esteatose e fibrose, selecionando-se as variáveis que nos testes univariados apresentaram níveis de significância inferiores a 0,10 ($p < 0,10$), mantendo-se nos modelos finais apenas as variáveis com nível de significância inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do Excel 2003 e do pacote estatístico SPSS, v.20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA).

3.5 Aspectos éticos

Coleta de dados realizada no período de 2010 a 2012 (componente retrospectivo)

O soro dos participantes foi coletado para a realização de exames laboratoriais do projeto MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS e guardado em freezer a -80°C , no LIM 47 – Laboratório de Hepatologia por Vírus do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foi aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - I) para que os sujeitos da pesquisa autorizassem a realização de exames laboratoriais para a presente pesquisa em soro coletado anteriormente (**Anexo 3**).

Coleta de dados realizada no período de 2013 a 2015 (componente prospectivo)

Os pacientes foram convidados a participar do presente estudo, havendo esclarecimentos sobre os objetivos e a metodologia do estudo. Foi aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - II) em que os sujeitos da pesquisa autorizaram a realização da entrevista, a coleta de sangue e a realização de exames laboratoriais (**Anexo 4**).

Participaram do estudo somente os pacientes que assinaram o termo de consentimento após esclarecimentos sobre a pesquisa (objetivos, metodologia, sigilo e riscos). Os investigadores se comprometeram a manter o anonimato e

o sigilo sobre a identidade de todos os indivíduos do estudo, que foram identificados por números.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP (CaPPesq nº 448.527) (**Anexo 5**).

4 RESULTADOS

No período compreendido entre janeiro de 2010 e dezembro 2015 foram incluídos 314 pacientes do Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, sendo 88 prospectivamente e 226 retrospectivamente.

4.1. Análise dos pacientes por tipo de estudo

Ao comparar as características basais dos pacientes do estudo retrospectivo e prospectivo, podemos observar que não houve diferença significativa entre os dois grupos, incluindo as frequências dos genótipos do polimorfismo do gene PNPLA3, da esteatose hepática e da fibrose avançada (**Tabela 7**). Esses resultados confirmam a viabilidade de reunir as casuísticas.

Tabela 7 - Características dos pacientes por tipo de estudo, retrospectivo ou prospectivo

Característica	Tipo de estudo		p
	Retrospectivo	Prospectivo	
n	226	88	
Idade (anos)	54,5	56,1	0,31
Sexo masculino (%)	99 (43,8%)	34 (38,6%)	0,41
Diabetes	35 (15,5%)	11 (12,5%)	0,50
IMC	27,25	26,23	0,18
Genótipo HCV 3	35 (15,5%)	12 (13,6%)	0,68
Nível de HCV > 850.000 IU/mL (%)	131 (58%)	44 (50,0%)	0,21
AST (UI/L)	49,85	49,75	0,98
ALT (UI/L)	61,70	62,56	0,89
HOMA-IR	3,30	4,05	0,36
Triglicérides (mg/dL)	107,14	111,50	0,59
Colesterol total (mg/dL)	172,43	174,49	0,68
LDL c (mg/dL)	95,71	92,58	0,45
HDL c (mg/dL)	55,03	56,26	0,60
Esteatose hepática ≥ 5%	108 (47,8%)	44 (50,0%)	0,73
Atividade inflamatória Metavir A2-A3	151 (75,7%)	63 (71,6%)	0,42
Fibrose hepática Metavir F3-F4	51 (22,6%)	14 (15,9%)	0,19
Genótipo PNPLA3			0,52
CC	94 (41,6%)	39 (44,3%)	
CG	49 (21,7%)	14 (15,9%)	
GG	66 (29,2%)	81 (92,0%)	

Valores são média ou números (%). Quando não houver outra unidade especificada, os valores se referem a número (%) de pacientes.

4.2 Características gerais

Dos participantes do estudo, 133 (42,4%) eram do sexo masculino e 181 (57,6%) do sexo feminino. A média das idades dos pacientes foi 54,96 anos e a mediana foi 57 anos, com uma variação de 28 a 82 anos. A média do índice de massa corpórea (IMC) dos pacientes foi de 27 kg e a mediana 26 kg, variando de 17,4 kg a 78,5 kg.

A distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3, dados demográficos e antropomórficos são mostrados na

Tabela 8.

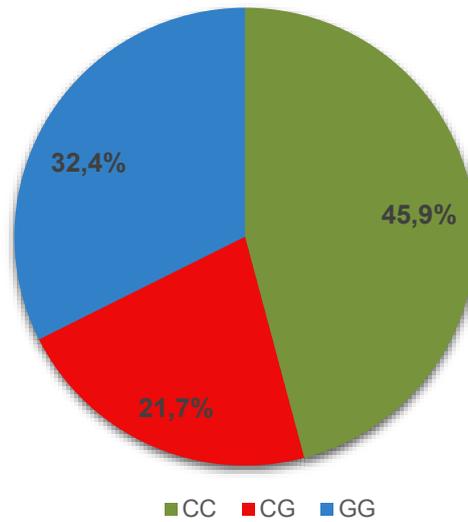
Tabela 8 - Distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3, dados demográficos e antropomórficos

Característica	N (%)
Polimorfismo PNPLA3¹	
CC	133 (45,9)
CG	63 (21,7)
GG	94 (32,4)
Sexo	
Masculino	133 (42,4)
Feminino	181 (57,6)
Idade (anos)	
18-30	3 (1)
31-40	55 (17,5)
41-50	46 (14,6)
51-60	92 (29,3)
≥ 60	118 (37,6)
IMC²	
<24,99	121 (38,6)
25,00-29,99	100 (31,8)
30-34,99	49 (15,6)
>35	20 (6,4)

¹ignorado: 14; ²ignorado: 8

Está apresentada no **Gráfico 1** a frequência do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 encontrada no presente estudo.

Gráfico 1: Frequência do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3



Em relação aos antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do vírus da hepatite C, 114 (36,3%) apresentaram história de ter recebido transfusão de sangue. Não observamos antecedente de risco em 119 (37,9%) pacientes.

A **Tabela 9** mostra a distribuição dos pacientes em relação aos fatores de risco conhecidos para aquisição do vírus da hepatite C e em relação ao fator etilismo.

Tabela 9 - Distribuição dos pacientes segundo antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do vírus da hepatite C e segundo etilismo

Antecedente /etilismo	N (%)
Transfusão de sangue¹	
Não	198 (63,5)
Sim	114 (36,5)
Uso de droga injetável²	
Não	287 (92,6)
Sim	23 (7,4)
Uso de droga por via inalatória³	
Não	271 (86,9)
Sim	41 (13,1)
Tatuagem⁴	
Não	267 (86,1)
Sim	43 (13,9)
Acupuntura⁵	
Não	252 (81)
Sim	59 (19)
Parceiro HCV positivo⁶	
Não	252 (80,3)
Sim	28 (8,9)
Etilismo	
Não	200 (63,7)
<20g	53 (16,9)
20-50g	32 (10,2)
>50g	24 (7,6)

¹ignorado:2; ²ignorado:2; ³ignorado:4; ⁴ignorado:3; ⁵ignorado:4; ⁶ignorado: 34

A **Tabela 10** mostra a distribuição dos pacientes em relação a comorbidades. A maioria dos pacientes não apresentou hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou hipotireoidismo.

Tabela 10 - Distribuição dos pacientes segundo comorbidades

Comorbidades	N (%)
HAS¹	
Não	203 (64,6)
Sim	111 (35,4)
Diabetes mellitus	
Não	268 (85,4)
Sim	46 (14,6)
Hipotireoidismo	
Não	276 (87,9)
Sim	38 (12,1)

¹Hipertensão arterial sistêmica

Os níveis séricos médios de exames laboratoriais selecionados são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Distribuição dos participantes do estudo segundo exames laboratoriais selecionados

Avaliação laboratorial (sérica)	Média	Varição
Glicose ¹ (mg/dL)	93,1	44 a 597
Insulina ² (μU/mL)	15,2	2,5 a 524,3
ALT (U/L)	61,9	11 a 333
AST (U/L)	49,8	11 a 289
GGT (U/L)	84,4	8 a 733
Colesterol total (mg/dL)	173	69 a 399
LDL (mg/dL)	94,9	12 a 211
HDL ³ (mg/dL)	55,4	20 a 144
VLDL ⁴ (mg/dL)	23,6	2 a 237
Triglicérides (mg/dL)	108,4	28 a 502
HOMA-IR ^{5,6}	3,51	0,32 a 97,09

¹valor ignorado:1; ²valor ignorado: 15; ³valor ignorado: 1; ⁴valor ignorado: 1; ⁵HOMA-IR: *homeostatic model assessment*; ⁶valor ignorado: 15

A distribuição dos pacientes segundo as características do vírus da hepatite C é mostrada na **Tabela 12**. Cerca de 80% dos pacientes apresentou infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 1 e somente 1,3% deles apresentou infecção pelo genótipo 5. Nenhum apresentou infecção pelo genótipo 4.

Tabela 12 - Distribuição dos pacientes segundo características do vírus da hepatite C

Características do Vírus	N (%)
Genótipo¹	
1a ou 1b	245 (79,3)
2 a ou 2b	13 (4,2)
3a ou 3b	47 (15,2)
5a ou 5b	4 (1,3)
RNA-HCV (UI/mL)	
≤850.000	139 (44,3)
>850.000	175 (55,7)

¹ ignorado: 5

A **Tabela 13** mostra a distribuição dos pacientes em relação às características do estudo anatomopatológico de fragmento hepático, segundo classificação da Sociedade Brasileira de Hepatologia (Gayotto, 2000) e Metavir (The French METAVIR Cooperative Study Group, 1994). Cerca de 20% dos pacientes apresentou fibrose avançada (F3-4), 68% atividade necro-inflamatória moderada ou intensa e 48,4% apresentou esteatose hepática.

Tabela 13 - Distribuição dos pacientes, segundo características do estudo anatomopatológico de fragmento hepático

Característica	N (%)
Alteração estrutural¹	
0-1	178 (56,7)
2	71 (22,6)
3-4	65 (20,7)
Inflamação portal¹	
0-1	44 (14)
2	165 (52,5)
3-4	105 (33,5)
Atividade periportal¹	
0-1	60 (19,1)
2	125 (39,8)
3-4	129 (41,1)
Atividade parenquimatosa¹	
0-1	103 (31,8)
2	167 (53,2)
3-4	44 (14)
Esteatose²	
0	162 (51,6)
1	106 (33,8)
2	39 (12,4)
3	7 (2,2)
Siderose	
0	256 (81,5)
1	17 (5,4)
2	41 (13,1)
3	0
Atividade inflamatória³	
Ausente	3 (1)
Leve	97 (30,9)
Moderada	167 (53,2)
Intensa	47 (15)
Grau de fibrose³	
Ausente	45 (14,3)
Portal sem Septos	133 (42,4)
Portal com Raros Septos	71 (22,6)
Numerosos Septos sem Cirrose	37 (11,8)
Cirrose	28 (8,9)

¹Sociedade Brasileira de Hepatologia; ²Kleiner et al.; ³Metavir

4.3 Fatores associados à esteatose hepática

O resultado da análise univariada de fatores demográficos e epidemiológicos, segundo presença de esteatose hepática são mostrados na **Tabela 14**. O grupo de pacientes com esteatose hepática apresentou maior proporção de pessoas com mais idade, que receberam transfusão sanguínea, com antecedente de acupuntura e maior valor de índice de massa corpórea do que o grupo sem esteatose hepática.

Tabela 14 - Distribuição dos pacientes em relação aos dados demográficos e epidemiológicos, segundo a presença de esteatose hepática

Variável	Esteatose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
Sexo (n/%)						0,219
Masculino	74 (45,7)	59 (38,8)	1,00			
Feminino	88 (54,3)	93 (61,2)	1,33	0,85	2,08	
Transfusão (n/%)						0,038
Não	111 (68,5)	87 (57,2)	1,00			
Sim	50 (30,9)	64 (42,1)	1,63	1,03	2,60	
Droga inalatória (n/%)						0,319
Não	136 (83,9)	135 (88,8)	1,00			
Sim	24 (14,8)	17 (11,2)	0,71	0,37	1,39	
Droga injetável (n/%)						0,930
Não	147 (90,7)	140 (92,1)	1,00			
Sim	12 (7,4)	11 (7,2)	0,96	0,41	2,25	
Acupuntura (n/%)						0,018
Não	137 (84,6)	115 (75,7)	1,00			
Sim	22 (13,6)	37 (24,3)	2,00	1,12	3,59	
Tatuagem (n/%)						0,756
Não	136 (83,9)	131 (86,2)	1,00			
Sim	23 (14,2)	20 (13,2)	0,90	0,47	1,72	
Parceiro VHC (n/%)						0,720
Não	126 (77,8)	126 (82,9)	1,00			
Sim	15 (9,3)	13 (8,6)	0,87	0,40	1,90	
Etilismo (n/%)						0,796
Não	104 (64,2)	96 (63,2)	1,00			
Sim	55 (33,9)	54 (35,5)	1,06	0,67	1,70	
Idade (anos)			1,039	1,019	1,059	<0,001
média (DP)	52,4 (11,6)	57,7 (11,7)				
mediana (mín.; máx.)	53 (28; 76)	60,5 (29; 82)				
IMC			1,089	1,033	1,147	0,001
média (DP)	25,8 (3,9)	28,1 (7,5)				
mediana (mín.; máx.)	25,7 (17,4; 38,3)	26,5 (17,9; 78,5)				

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; DP: Desvio Padrão

A distribuição dos pacientes em relação as comorbidades segundo presença de esteatose são mostrados na **tabela 15**. Pacientes hipertensos estavam em proporção maior no grupo que apresentou esteatose hepática.

Tabela 15 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose hepática

Variável	Esteatose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
HAS¹ (n/%)						0,029
Não	114 (70,4)	89 (58,6)	1,00			
Sim	48 (29,6)	63 (41,5)	1,68	1,05	2,68	
Diabetes mellitus (n/%)						0,383
Não	114 (70,4)	89 (58,6)	1,00			
Sim	48 (29,6)	63 (41,5)	1,68	1,05	2,68	
Hipotireoidismo (n/%)						0,834
Não	143 (88,3)	133 (87,5)	1,00			
Sim	19 (11,7)	19 (12,5)	1,08	0,55	2,12	

OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança; DP: Desvio Padrão

¹Hipertensão arterial sistêmica

A **Tabela 16** mostra a distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose (análise univariada). Os pacientes com esteatose apresentaram menor nível sérico de LDL e maior atividade de AST, ALT e GGT do que os pacientes sem esteatose.

Tabela 16 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose hepática

Variável	Esteatose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
Glicose			1,004	0,998	1,009	0,166
média (DP)	89,4 (43,3)	97 (53,5)				
mediana (mín.; máx.)	80 (50; 444)	86 (44; 597)				
Insulina			1,001	0,993	1,008	0,850
média (DP)	14,8 (42,3)	15,5 (11,6)				
mediana (mín.; máx.)	9,8 (2,5; 524,3)	12,5 (2,6; 82,5)				
HOMA			1,019	0,975	1,065	0,409
média (DP)	3,2 (8,1)	3,8 (3,7)				
mediana (mín.; máx.)	2 (0,4; 97)	2,8 (0,6; 27,6)				
ALT			1,006	1,001	1,011	0,022
média (DP)	55,9 (46,3)	68,4 (50)				
mediana (mín.; máx.)	44 (11; 333)	52,5 (12; 311)				
AST			1,009	1,002	1,015	0,008
média (DP)	44,3 (35,4)	55,7 (40,6)				
mediana (mín.; máx.)	34 (11; 289)	42 (13; 251)				
GGT			1,006	1,003	1,009	<0,001
média (DP)	64,2 (59,5)	106 (117,6)				
mediana (mín.; máx.)	46,5 (8; 361)	64 (10; 733)				
Colesterol			0,995	0,989	1,000	0,062
média (DP)	177 (41,4)	168,7 (37,1)				
mediana (mín.; máx.)	172 (104; 399)	164,5 (69; 252)				
LDL			0,989	0,982	0,997	0,003
média (DP)	100,2 (34,1)	89,2 (30,3)				
mediana (mín.; máx.)	97 (29; 211)	88 (12; 176)				
HDL			1,002	0,990	1,014	0,788
média (DP)	55,1 (16,5)	55,7 (20,8)				
mediana (mín.; máx.)	54 (25; 101)	53,5 (20; 144)				
VLDL			1,001	0,990	1,012	0,837
média (DP)	23,3 (23,5)	23,8 (16,1)				
mediana (mín.; máx.)	18 (7; 237)	20,5 (2; 112)				
Triglicérides			1,003	1,000	1,007	0,081
média (DP)	102,1 (55,1)	115,1 (74,4)				
mediana (mín.; máx.)	89,5 (34; 450)	101 (28; 502)				

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; DP: Desvio Padrão

Observamos na **Tabela 17** a distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo do gene PNPLA3 e características do vírus da hepatite C, segundo a presença de esteatose. O grupo de pacientes com esteatose apresentou maior proporção de portadores do genótipo GG e de CG do polimorfismo do gene PNPLA3 e de infecção pelo genótipo 3 do vírus da hepatite C do que o grupo sem esteatose.

Tabela 17 - Distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo do gene PNPLA3 e características do vírus da hepatite C, segundo a presença de esteatose hepática

Variável	Esteatose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
Genótipo PNPLA3 (n/%)						0,012
CC	80 (49,4)	53 (34,9)	1,00			
CG	28 (17,3)	35 (23,0)	1,89	1,03	3,46	
GG	39 (24,1)	55 (36,2)	2,13	1,24	3,64	
Genótipo PNPLA3 (n/%)						0,003
CC	80 (49,4)	53 (34,9)	1,00			
CG ou GG	67 (41,4)	90 (59,2)	2,03	1,27	3,24	
Genótipo PNPLA3 (n/%)						0,030
CC ou CG	108 (66,7)	88 (57,9)	1,00			
GG	39 (24,1)	55 (36,2)	1,73	1,05	2,85	
Genótipo viral (n/%)						0,020
Não 3	143 (88,3)	119 (78,3)	1,00			
3	17 (10,5)	30 (19,7)	2,12	1,12	4,03	
RNA-HCV (n/%)						0,82
≤850.000	73 (45,1)	66 (43,4)				
>850.000	89 (54,9)	85 (55,9)	1,05	0,67	1,65	

OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

O resultado da análise univariada em relação a fibrose, siderose e atividade inflamatória segundo presença de esteatose hepática são mostrados na **Tabela 18**. Fibrose hepática e atividade necro-inflamatória foram mais comuns no grupo de pacientes com esteatose do que no grupo sem esteatose.

Tabela 18 - Distribuição dos pacientes em relação ao exame histopatológico de fragmento hepático, segundo presença de esteatose hepática

Variável	Esteatose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente		Inferior	Superior	
Fibrose (n/%)						0,001
Ausente	140 (86,4)	109 (71,7)	1,00			
Presente (F3-F4)	22 (13,6)	43 (28,3)	2,51	1,42	4,45	
Siderose (n/%)						0,576
Ausente	134 (82,7)	122 (80,3)	1,00			
Presente	28 (17,3)	30 (19,7)	1,18	0,67	2,08	
Atividade inflamatória (n/%)						<0,001
Ausente/Leve	74 (45,7)	26 (17,1)	1,00			
Moderada/Intensa	88 (54,3)	126 (82,9)	4,08	2,42	6,88	

OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

A proporção de pacientes com maior idade, infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3, antecedente de transfusão de sangue e acupuntura, hipertensos, com fibrose hepática avançada (F3-4), atividade necro-inflamatória moderada ou intensa, maior índice de massa corpórea, maior atividade de AST, ALT e GGT e menor nível sérico de LDL foi maior no grupo de pacientes com esteatose do que no grupo sem esteatose hepática. Além disso, a proporção de portadores do genótipo GG do gene PNPLA3 foi maior no grupo com esteatose.

Para a análise multivariada, selecionamos as variáveis: idade, IMC, hipertensão, infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3, fibrose avançada, atividade inflamatória moderada a intensa, AST, GGT e genótipo do gene PNPLA3 (três categorias, modelo de herança dominante ou recessivo).

A **Tabela 19** mostra os OR associados às variáveis que permaneceram no modelo final da regressão logística múltipla em relação a esteatose, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com três categorias.

Tabela 19 - Fatores associados a esteatose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com três categorias

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Genótipo PNPLA3				
CC	1,00			
CG	2,73	1,36	5,48	0,005
GG	1,94	1,05	3,58	0,036
Genótipo				0,007
Não 3	1,00			
3	2,88	1,34	6,17	
Atividade inflamatória				0,000
Ausente/Leve	1,00			
Moderada/Intensa	3,37	1,85	6,15	
Idade (anos)	1,03	1,008	1,055	0,009
IMC	1,09	1,026	1,159	0,005
GGT	1,006	1,002	1,01	0,002

Regressão logística múltipla; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Observamos associação entre os portadores do genótipo CG do gene PNPLA3, do genótipo GG do gene PNPLA3, de infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa, maior índice de massa corpórea, maior atividade de GGT e maior idade com a esteatose hepática.

4.3.1 Fatores associados à esteatose hepática usando o modelo de herança dominante

A **Tabela 20** mostra os OR associados às variáveis que permaneceram no modelo final da regressão logística múltipla em relação à esteatose,

considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC vs CG ou GG (modelo dominante).

Tabela 20 - Fatores associados a esteatose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC vs CG ou GG

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Genótipo PNPLA3				0,013
CC	1,00			
CG ou GG	1,91	2,15	3,20	
Genótipo				0,008
Não 3	1,00			
3	2,58	1,25	5,33	
Atividade inflamatória				<0,001
Ausente/Leve	1,00			
Moderada/Intensa	3,13	1,76	5,55	
Idade (anos)	1,03	1,008	1,05	0,008
IMC	1,09	1,03	1,16	0,002
GGT	1,005	1,002	1,009	0,003

Regressão logística múltipla; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Utilizando o modelo de herança dominante, confirmamos a associação entre o genótipo CG ou GG com esteatose hepática.

4.3.2 Fatores associados à esteatose hepática usando o modelo de herança recessiva

A **Tabela 21** mostra os OR associados às variáveis que permaneceram no modelo final da regressão logística múltipla em relação a esteatose, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC ou CG vs GG (modelo recessivo).

Tabela 21 - Fatores associados a esteatose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC ou CG vs GG

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Idade (anos)	1,03	1,009	1,053	0,006
Genótipo				0,015
Não 3	1,00			
3	2,42	1,189	4,92	
Atividade inflamatória				<0,001
Ausente/Leve	1,00			
Moderada/Intensa	3,133	1,78	5,52	
IMC	1,091	1,030	1,155	0,003
GGT	1,005	1,002	1,009	0,004

Regressão logística múltipla; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Não observamos associação entre esteatose e os portadores do genótipo homozigoto (GG) do gene PNPLA3.

4.4 Fatores associados à fibrose hepática

O resultado da análise univariada em relação aos dados demográficos e epidemiológicos, segundo a presença de fibrose hepática é mostrado na **Tabela 22**. Observamos que as variáveis maior idade, sexo masculino, antecedente de transfusão de sangue e uso de droga por via inalatória foram significantes no grupo com fibrose avançada (F3-4).

Tabela 22 - Distribuição dos pacientes em relação aos dados demográficos e epidemiológicos, segundo a presença de fibrose hepática

Variável	Fibrose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente (F3-4)		Inferior	Superior	
Sexo (n/%)						<0,001
Masculino	92 (36,9)	41 (63,1)	2,92	1,66	5,13	
Feminino	157 (63,0)	24 (36,9)	1,00			
Transfusão¹ (n/%)						0,027
Não	165 (66,3)	33 (50,8)	1,00			
Sim	83 (33,3)	31 (47,7)	1,87	1,07	3,26	
Droga inalatória² (n/%)						0,024
Não	220 (88,4)	51 (78,5)	1,00			
Sim	27 (10,8)	14 (21,5)	2,24	1,10	4,57	
Droga injetável³ (n/%)						0,109
Não	230 (92,4)	57 (87,7)	1,00			
Sim	15 (6,0)	8 (12,3)	2,15	0,87	5,32	
Acupuntura⁴ (n/%)						0,342
Não	202 (81,1)	50 (76,9)	1,00			
Sim	44 (17,7)	15 (23,1)	1,38	0,71	2,67	
Tatuagem⁵ (n/%)						0,423
Não	213 (85,6)	54 (83,1)	1,00			
Sim	32 (12,9)	11 (16,9)	1,36	0,64	2,86	
Parceiro VHC⁶ (n/%)						0,627
Não	199 (79,9)	53 (81,5)	1,00			
Sim	21 (8,4)	7 (10,8)	1,25	0,51	3,10	
Etilismo (n/%)						0,89
Não	163 (65,5)	42 (64,6)	1,00			
Sim	86 (34,5)	23 (35,4)	1,01	0,57	1,78	
Idade (anos)			1,054	1,026	1,081	<0,001
média (DP)	53,6 (12,2)	60,3 (9,3)				
mediana (mín.; máx.)	55 (28; 82)	62 (37; 76)				
IMC			0,994	0,948	1,042	0,802
média (DP)	27 (6,3)	26,8 (4,8)				
mediana (mín.; máx.)	26,1 (17,4; 78,5)	25,6 (18; 38,4)				

¹ignorado:2; ²ignorado:2; ³ignorado:4; ⁴ignorado:3; ⁵ignorado:4; ⁶ignorado:34; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; DP: Desvio Padrão

A distribuição dos pacientes em relação as comorbidades segundo presença de esteatose é mostrada na **Tabela 23**. A proporção de pacientes com hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus foi significativa no grupo com fibrose avançada.

Tabela 23 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de esteatose hepática

Variável	Fibrose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente (F3-4)		Inferior	Superior	
HAS (n/%)						0,001
Não	172 (69,1)	31 (47,7)	1,00			
Sim	77 (30,9)	34 (52,3)	2,45	1,41	4,27	
DM (n/%)						<0,001
Não	225 (90,4)	43 (66,2)	1,00			
Sim	24 (9,6)	22 (33,9)	4,80	2,47	9,32	
Tireoide (n/%)						0,099
Não	215 (86,4)	61 (93,9)	1,00			
Sim	34 (13,7)	4 (6,2)	0,42	0,14	1,21	

OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

O resultado da análise univariada em relação a exames laboratoriais selecionados segundo a presença de fibrose hepática é mostrado na **Tabela 24**. Os níveis séricos de glicose, ALT, AST e GGT estavam mais elevados no grupo com fibrose avançada; o nível sérico de colesterol estava diminuído no grupo com fibrose avançada.

Tabela 24 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de fibrose hepática

Variável	Fibrose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente (F3-4)		Inferior	Superior	
Glicose			1,013	1,006	1,021	0,003
média (DP)	86,6 (31,9)	118 (82,2)				
mediana (mín.; máx.)	81 (44; 444)	92 (57; 597)				
Insulina			1,002	0,995	1,010	0,558
média (DP)	14,7 (34,2)	17,3 (15,8)				
mediana (mín.; máx.)	10,9 (2,5; 524,3)	13,5 (2,5; 106,5)				
HOMA			1,034	0,987	1,083	0,164
média (DP)	3,2 (6,5)	4,9 (5,3)				
mediana (mín.; máx.)	2,1 (0,4; 97)	3,1 (0,8; 27,6)				
ALT			1,009	1,004	1,015	0,001
média (DP)	56,5 (44,4)	82,8 (57,4)				
mediana (mín.; máx.)	44 (11; 333)	71 (12; 268)				
AST			1,016	1,009	1,024	<0,001
média (DP)	43,9 (32,8)	72,3 (48,9)				
mediana (mín.; máx.)	34 (11; 289)	60 (21; 232)				
GGT			1,006	1,003	1,008	<0,001
média (DP)	72,4 (83,3)	130,5 (118,4)				
mediana (mín.; máx.)	43 (8; 733)	95 (19; 628)				
Colesterol			0,991	0,983	0,998	0,017
média (DP)	175,7 (39,2)	162,6 (39,4)				
mediana (mín.; máx.)	172 (69; 399)	156 (90; 252)				
LDL			0,992	0,983	1,001	0,072
média (DP)	96,5 (32,6)	88,3 (32,7)				
mediana (mín.; máx.)	94 (12; 211)	82 (33; 176)				
HDL			0,989	0,974	1,005	0,172
média (DP)	56,1 (19,3)	52,6 (15,8)				
mediana (mín.; máx.)	54 (21; 144)	53 (20; 113)				
VLDL			0,999	0,984	1,013	0,838
média (DP)	23,7 (21,4)	23,1 (15)				
mediana (mín.; máx.)	20 (2; 237)	19 (8; 101)				

Continua

Tabela 24 - Distribuição dos pacientes em relação a exames laboratoriais selecionados, segundo presença de fibrose hepática (Conclusão)

Variável	Fibrose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente (F3-4)		Inferior	Superior	
Triglicérides			1,000	0,996	1,004	0,930
média (DP)	108,2 (66,6)	109 (61,2)				
mediana (mín.; máx.)	94 (28; 502)	94 (47; 429)				

OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança; DP: Desvio Padrão

Na **Tabela 25** encontra-se a distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 e características do vírus da hepatite C, segundo a presença de fibrose hepática.

A proporção de pacientes portadores do genótipo do gene PNPLA3 CG ou GG, com infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3 e com RNA-HCV sérico >850.000 UI/mL foi significativamente maior no grupo com fibrose avançada.

Tabela 25 - Distribuição dos pacientes em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 e características do vírus da hepatite C, segundo a presença de fibrose hepática

Variável	Fibrose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente (F3-4)		Inferior	Superior	
Genótipo PNPLA3¹ (n/%)						0,133
CC	113 (45,4)	20 (30,8)	1,00			
CG	49 (19,7)	14 (21,5)	1,61	0,75	3,46	
GG	70 (28,1)	24 (36,9)	1,94	1,00	3,76	
Genótipo PNPLA3¹ (n/%)						0,035
CC	113 (45,4)	20 (30,8)	1,00			
CG ou GG	119 (47,8)	38 (58,5)	1,81	1,05	3,35	
Genótipo PNPLA3¹ (n/%)						0,060
CC ou CG	162 (61,1)	34 (52,3)	1,00			
GG	70 (28,1)	24 (36,9)	1,69	0,98	2,95	
Genótipo² (n/%)						0,095
Não 3	212 (85,2)	50 (76,9)	1,00			
3	33 (13,3)	14 (21,5)	1,80	0,90	3,61	
RNA-HCV (UI/mL) (n/%)						0,015
≤850.000	119 (47,8)	20 (30,8)				
>850.000	130 (52,2)	45(69,2)	2,06	1,15	3,68	

¹ignorado:14; ²ignorado: 5; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança

O resultado da análise univariada em relação a siderose, esteatose e atividade necro-inflamatória, segundo a presença de fibrose hepática são mostrados na **Tabela 26**. A proporção de pacientes com esteatose hepática e atividade necro-inflamatória moderada ou intensa foi significativamente maior no grupo de pacientes com fibrose avançada.

Tabela 26 - Distribuição dos pacientes em relação ao exame histopatológico de fragmento hepático, segundo presença de fibrose hepática

Variável	Fibrose		OR	IC (95%)		p
	Ausente	Presente (F3-4)		Inferior	Superior	
Siderose (n/%)						0,073
Ausente	208 (83,5)	48 (73,9)	1,00			
Presente	41 (16,5)	17 (26,2)	1,80	0,94	3,43	
Esteatose (n/%)						0,001
Ausente	140 (56,2)	22 (33,9)	1,00			
Presente	109 (43,8)	43 (66,1)	2,51	1,42	4,45	
Atividade inflamatória (n/%)						<0,001
Ausente/Leve	97 (38,9)	3 (4,6)				
Moderada/Intensa	152 (61,1)	62 (95,4)	13,19	4,03	43,19	

OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Observamos associação entre sexo masculino, maior idade, antecedente de transfusão sanguínea e uso de droga por via inalatória, hipertensão arterial, diabetes mellitus, esteatose hepática, atividade necro-inflamatória, RNA-HCV sérico >850.000 UI/mL, níveis elevados de glicose, AST, ALT e GGT e níveis diminuídos de colesterol e fibrose avançada. Além disso, a proporção de portadores do genótipo CG ou GG do polimorfismo do gene PNPLA3 foi significativamente maior no grupo de pacientes com fibrose avançada.

Para a análise multivariada, selecionamos as variáveis: sexo masculino, idade, hipertensão, esteatose hepática, atividade necro-inflamatória moderada a intensa, RNA-HCV sérico >850.000 UI/mL, níveis elevados de glicose, AST, ALT, GGT e colesterol. Incluímos para essa análise o genótipo do polimorfismo do gene PNPLA3 (3 categorias).

A **Tabela 27** mostra os OR associados às variáveis que permaneceram no modelo final da regressão logística múltipla em relação a fibrose, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com três categorias.

Tabela 27 - Fatores associados a fibrose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com três categorias

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Sexo				<0,001
Masculino	6,50	2,93	14,42	
Feminino	1,00			
Atividade inflamatória				0,003
Ausente/Leve	1,00			
Moderada/Intensa	10,08	2,25	45,11	
Esteatose				0,02
Ausente	1,00			
Presente	2,56	1,16	5,63	
Idade	1,05	1,015	1,089	0,005
AST	1,012	1,004	1,020	0,004

Regressão logística múltipla; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Os fatores associados à fibrose hepática foram: sexo masculino, maior idade, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa, esteatose hepática e níveis elevados de AST. Não observamos associação entre o genótipo do gene PNPLA3 e fibrose hepática.

4.4.1 Fatores associados à fibrose hepática usando o modelo de herança dominante

A **Tabela 28** mostra os OR associados às variáveis que permaneceram no modelo final da regressão logística múltipla em relação a fibrose, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC vs CG ou GG.

Tabela 28 - Fatores associados a fibrose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC vs CG ou GG

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Sexo				<0,001
Masculino	4,41	2,25	8,64	
Feminino	1,00			
Atividade inflamatória				<0,001
Ausente/Leve	1,00			
Moderada/Intensa	8,94	2,61	30,59	
Idade	1,06	1,03	1,09	0,001
AST	1,011	1,002	1,017	0,012
GGT	1,003	1,000	1,007	0,032

Regressão logística múltipla; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Os fatores associados à fibrose hepática foram: sexo masculino, maior idade, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa e níveis elevados de AST e GGT. Não observamos associação entre o genótipo do gene PNPLA3 e fibrose hepática.

4.4.2 Fatores associados à fibrose hepática, usando o modelo de herança recessiva

A **Tabela 29** mostra os OR associados às variáveis que permaneceram no modelo final da regressão logística múltipla em relação a fibrose, considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC ou CG vs GG.

Tabela 29 - Fatores associados a fibrose hepática considerando o genótipo do gene PNPLA3 com CC ou CG vs GG

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Sexo				<0,001
Masculino	4,41	2,25	8,64	
Feminino	1,00			
Atividade inflamatória				<0,001
Ausente/Leve	1,00			
Moderada/Intensa	8,94	2,61	30,59	
Idade	1,06	1,03	1,09	0,001
AST	1,011	1,002	1,017	0,012
GGT	1,003	1,000	1,007	0,032

Regressão logística múltipla; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança

Os fatores associados à fibrose hepática foram: sexo masculino, maior idade, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa e níveis elevados de AST e GGT. Não observamos associação entre o genótipo do gene PNPLA3 e fibrose hepática.

5 DISCUSSÃO

Esse trabalho permitiu analisar a influência do polimorfismo do gene da PNPLA3 sobre a esteatose hepática e o grau fibrose nos 314 pacientes incluídos no estudo com diagnóstico de hepatite C crônica, atendidos no Hospital das Clínicas da FMUSP. Nesse estudo verificou-se ainda a associação entre fatores metabólicos e fatores virais com a presença de esteatose hepática e grau de fibrose hepática nesses pacientes.

5.1 Fatores associados à esteatose hepática

Os fatores que mostraram associação positiva com esteatose foram: alelo G (CG e GG), idade, IMC elevado, infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3, atividade necro-inflamatória e níveis elevados de GGT.

A esteatose é um achado histológico frequente em pacientes portadores do vírus da hepatite C (HCV) (Moriya et al., 1999). O genótipo 3 do HCV desempenha um importante papel no desenvolvimento da esteatose (Adinolfi et al., 2001). Níveis séricos do RNA, atividade necro-inflamatória, presença de fibrose, fatores metabólicos, como IMC, resistência à insulina e diabetes, aumento das transaminases, consumo de álcool abusivo e fatores demográficos como sexo masculino e idade avançada parecem estar envolvidos no desenvolvimento da esteatose. Fatores genéticos ligados ao hospedeiro podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da esteatose, dentre eles o polimorfismo do rs738409 do gene da PNPLA3.

Os primeiros estudos a encontrarem associação do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 com a esteatose foi em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica. Romeo et al. (2008) associaram o alelo G do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 com aumento da gordura no fígado e inflamação hepática em portadores de DHGNA. Em 2009, Sookoian et al., relataram que o alelo G do polimorfismo rs738409 foi significativamente associado com DHGNA ($p < 0,001$). Sookoian et al. (2011), em uma revisão sistemática, mostraram em seus resultados a influência do genótipo GG do rs738409 com a suscetibilidade das formas mais graves da doença como NASH.

Valenti et al. (2012) relataram que genótipo GG do polimorfismo rs738409 foi associado com a presença de esteatose (OR: 1,75; IC 95%: 1,28-2,49; $p = 0,001$), independentemente de ALT e GGT. No modelo de regressão logística, o genótipo GG do polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3 permaneceu independentemente associado à esteatose (OR: 3,18; IC 95%: 1,65-6,69; $p = 0,001$). As mesmas observações quanto ao polimorfismo rs738409 foram feitas por vários outros autores (Trepó et al., 2011; Stattermayer et al., 2014; Yasui et al., 2015). A **Tabela 30** mostra as observações feitas por esses autores.

Tabela 30 - Estudos que associaram a esteatose com o polimorfismo rs738409 de acordo com o modelo recessivo

Referência	Etnia	Genótipo HCV	Esteatose <5%		Esteatose >5%		p
			N	CC+CG/GG	N	CC+CG/GG	
Valenti et al., 2012	Caucasiano	1, 2, 3, 4	196	189/7	406	364/42	0,001
Stattermayer et al., 2014	Caucasiano	1, 4	147	145/2	213	190/23	0,028
Trepo et al., 2011	Caucasiano	1, 2, 3, 4	264	257/7	273	242/31	0,012
Yasui et al., 2015	Asiáticos		239	195/44	37	23/14	0,003

Baseado em Fan et al. (2016)

Desde o final da década de 1990, vários fatores vêm sendo associados à presença de hepatite C crônica, incluindo índice de massa corpórea (Hourigan et al., 1999; Hwang et al., 2001), idade (Poynard et al., 2003; Asselah et al., 2003; Paton et al., 2004), genótipo 3 (Mihm et al., 1997; Rubbia-Brandt et al., 2000), atividade histológica (Adinolfi et al., 2001) e níveis elevados de GGT (Hwang et al., 2001; Adinolfi et al., 2001).

Hourigan et al., em 1999, investigaram 148 pacientes com hepatite C crônica não tratados e constataram que 61% apresentaram esteatose. Na análise multivariada, observou-se que o IMC estava associado à esteatose ($p < 0,0001$). A média do IMC dos pacientes sem esteatose foi de 23,9 +/- 4,3 kg/m², enquanto que para o grau 1 o IMC foi de 26,5 +/- 5,1 kg/m² e para o grau 2 e 3 agrupados o IMC foi de 28,4 +/- 4,9 kg/m². Em um estudo, Hwang et al. (2001) observaram que cinquenta e cinco (52%) de 106 pacientes com hepatite C crônica apresentaram esteatose hepática. Os pacientes com esteatose hepática apresentaram níveis séricos maiores de triglicérides e de GGT, maior

IMC e maior prevalência de obesidade quando comparados com pacientes sem esteatose.

Patton et al. (2004) ao estudarem 574 pacientes infectados pelo HCV de um único centro observaram que as variáveis idade, duração da infecção, IMC e infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3 ($p < 0,001$ para todas as variáveis) estavam associadas à esteatose hepática. Os níveis de RNA-HCV foram significativamente associados com esteatose em pacientes com infecção pelo genótipo 3 ($p < 0,003$). Poynard et al. (2003) e Asselah et al. (2003) encontraram também associação entre idade e esteatose hepática.

Em 1997, Mihm et al. avaliaram 90 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C em relação a características histopatológicas, exames bioquímicos, dados demográficos e genótipo do vírus da hepatite C. Os autores observaram uma maior prevalência de esteatose e lesões ductais em pacientes com infecção pelo genótipo 3a comparado com pacientes infectados pelos genótipos 1 ou 1b. A associação foi subsequentemente confirmada por Rubbia-Brandt et al., em 2000. Estes últimos observaram esteatose em 41 pacientes (40,6%) de um total de 101 pacientes com hepatite C crônica, independente de sexo, idade ou modo de infecção. A infecção pelo vírus da hepatite C genótipo 3 mostrou-se associada a maiores pontuações de esteatose do que outros genótipos.

Adinolfi et al. (2001) avaliaram o papel da esteatose na progressão de danos no fígado, como a fibrose, em uma coorte de 180 pacientes com hepatite C, bem como sua relação com fatores virais, como o genótipo do vírus e níveis de RNA, e do hospedeiro, como IMC e distribuição da gordura visceral. Quarenta e oito por cento dos pacientes apresentou esteatose e uma maior

prevalência de esteatose foi observada na infecção pelo genótipo 3a ($p < 0,01$). Encontraram associação da esteatose com o índice de atividade histológica ($p < 0,007$). Os pacientes com grau de esteatose $> 30\%$ mostraram níveis mais elevados de GGT e ALT ($p < 0,001$). A análise por único genótipo mostrou uma associação significativa entre o grau de esteatose e IMC na infecção pelo genótipo 1 ($p < 0,001$) e com os níveis de RNA do HCV na infecção pelo genótipo 3a ($p < 0,001$). Distribuição de gordura visceral mostrou estar associada à esteatose ($p < 0,001$).

Não encontramos associação entre resistência à insulina e esteatose hepática. É possível que o tipo de pacientes incluídos, isto é, a grande parte deles com IMC normal, não tenha propiciado poder estatístico ao estudo para testar essa associação.

5.2 Fatores associados à fibrose hepática

Encontramos associação positiva entre fibrose hepática avançada (F3-4) e sexo masculino, maior idade, atividade necro-inflamatória, esteatose hepática e níveis elevados de AST e GGT.

É bem documentada a associação entre progressão da fibrose ou fibrose avançada com idade à infecção e sexo masculino (Poynard et al., 1997; Ryder et al., 2004), atividade histológica (Yano et al., 1996; Ghany et al., 2003), esteatose hepática (Castéra et al., 2003; Rubbia-Brandt et al., 2004) e níveis elevados de AST (Boccatto et al., 2006).

Poynard et al. (2001) realizaram um estudo com 2313 pacientes não tratados para HCV. Sete fatores de risco foram avaliados: idade à biópsia,

sexo, consumo de álcool, modo de infecção, grau de atividade inflamatória, genótipo do vírus da hepatite C e níveis de RNA. Três fatores independentes foram associados ($p < 0,001$) com uma taxa de progressão da fibrose mais rápida: idade no momento da infecção, consumo de álcool de 50 g ou mais por dia, e o sexo masculino. O modo de infecção, atividade histológica, genótipo e a carga viral não foram independentemente associados com fibrose. Progressão da fibrose foi principalmente dependente da idade de cinquenta anos ou mais. Ryder et al. (2004) investigaram os fatores de risco para progressão da doença hepática em 214 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C que apresentavam doença hepática leve e que foram acompanhados prospectivamente sem tratamento. Os autores observaram que os fatores preditores para a progressão da doença hepática foram idade à primeira biópsia e qualquer grau de fibrose na primeira biópsia. A taxa global de progressão da fibrose foi baixa, mas aumentou nos pacientes com mais idade ou com fibrose na primeira biópsia.

Yano et al. (1996) avaliaram fragmentos hepáticos de 70 pacientes com hepatite C crônica, coletados no período de 1 a 26 anos (média 8,8 anos). No seguimento, 35 pacientes desenvolveram cirrose. Esta se desenvolveu em todos os pacientes com alto grau de necro-inflamação na biópsia inicial que foram seguidos por 10 anos e em 96% dos pacientes com grau intermediário que foi seguido por 17 anos. Somente 30,4% dos pacientes com baixo grau na biópsia inicial desenvolveu cirrose após 13 anos. Ghany et al. (2003) avaliaram uma coorte de 123 pacientes com hepatite crônica C usando biópsia hepática para avaliar a taxa e preditores de progressão da fibrose. Entre 123 pacientes, 48 (39%) apresentaram progressão na pontuação da fibrose, 46 (37%) não

mostraram nenhuma mudança e 29 (24%) apresentaram melhora. Daqueles com fibrose, 9% apresentaram progressão para cirrose. A taxa global de progressão foi de 0,12 unidades de fibrose por ano, uma taxa que prevê a progressão para cirrose em 50 anos, se progressão foi linear. A taxa de progressão da fibrose foi variável, e foi maior entre os pacientes com idade mais avançada, aqueles com níveis séricos de alanina e aspartato aminotransferase mais elevados e aqueles com necrose periportal extensa na biópsia hepática inicial. Em um estudo metanálise de pacientes individuais, os autores conduziram uma avaliação de 3068 pacientes com hepatite C crônica confirmada histologicamente e recrutados de 10 centros na Itália, Suíça, França, Austrália e EUA. Esteatose estava presente em 1561 pacientes (50.9%) e fibrose em 2688 (87.6%). Por regressão logística múltipla, a esteatose mostrou-se associada independentemente ao genótipo 3 do vírus da hepatite C, à fibrose hepática, diabetes mellitus, à atividade inflamatória histológica, ao etilismo, ao IMC e à idade avançada. Fibrose estava associada à atividade inflamatória, esteatose, sexo masculino e idade avançada. Em análise de subgrupos, a associação entre esteatose e fibrose invariavelmente foi dependente da associação simultânea entre esteatose e inflamação hepática (Leandro et al., 2006).

Castéra et al. (2003) avaliaram 90 pacientes com hepatite C, virgens de tratamento e que tinham biópsias hepáticas pareadas. O intervalo médio entre as biópsias foi de 48 meses. A piora da esteatose foi significativamente associada à progressão da fibrose hepática em pacientes com (p=0,03) e sem (p<0,03) esteatose na primeira biópsia. Rubia-Brandt et al., (2000) em um estudo realizado com 101 pacientes encontrou associação da fibrose com

atividade inflamatória ($p < 0,001$), idade ($p < 0,001$), esteatose ($p = 0,001$), abuso de álcool por mais de 5 anos ($p = 0,015$) e IMC ($p = 0,034$).

Boccatto et al. (2006) estudaram as taxas e determinantes da progressão da fibrose na hepatite C crônica. Cento e seis pacientes (idade média de $41,65 \pm 12,83$ anos), com infecção crônica pelo HCV, não tratados e com fibrose mínima na biópsia hepática inicial (F0/F1 por METAVIR) foram seguidos prospectivamente com biópsia, que foi repetida após 5 ou mais anos (média do intervalo de $7,8 \pm 1,51$ anos). Sessenta e quatro pacientes (60,4%) apresentaram progressão da fibrose. A progressão para F3 ou cirrose foi observada em 36% das pessoas com F1 inicial. A progressão da fibrose foi associada com a idade ($p < 0,0001$), alanina aminotransferase (ALT) ($p = 0,005$), atividade histológica ($p = 0,004$) e esteatose ($p = 0,002$) na fase inicial da biópsia e a utilização de álcool ($p = 0,008$). Esse estudo reforça a ideia de que a fibrose é facilitada pela idade avançada e álcool e associada com os níveis de atividade inflamatória e ALT.

Em relação ao polimorfismo rs738409 do gene da PNPLA3, vários autores (Valenti et al., 2011; Trepó et al., 2011; Stattermayer et al., 2014) observaram que o genótipo GG estava associado a maior risco de fibrose avançada, enquanto que em um estudo realizado em Taiwan (Huang, 2015) observou-se que o alelo G (CG+GG) estava associado a esse mesmo evento, isto é, maior grau de fibrose. No entanto esses achados não foram unânimes. Em um estudo japonês (Nakamura et al., 2013), os autores não encontraram associação entre o alelo G (CG+GG) do polimorfismo do gene PNPLA3 e fibrose avançada. Os próprios autores aventam algumas hipóteses para esses diferentes achados, como a utilização de ultrassom para diagnosticar esteatose

e grau de fibrose, etnia diversa e diferente distribuição dos genótipos do gene PNPLA3 no Japão. Em outro estudo japonês, não se observou associação entre os genótipos do gene PNPLA3 (GG) e fibrose avançada (Miyashita et al., 2012).

Em nosso estudo, não encontramos associação entre fibrose avançada e o polimorfismo rs738409 do gene de PNPLA3. Não acreditamos que tenha havido algum erro na avaliação da presença de esteatose ou grau de fibrose, pois todos os pacientes foram avaliados através do estudo de fragmento hepático, que é considerado padrão-ouro para essas situações. A maioria dos estudos avalia pacientes de origem caucasiana ou asiáticos; não podemos afirmar que a etnia dos pacientes brasileiros seja uma ou outra e nem que a distribuição dos genótipos seja semelhante. O poder estatístico do estudo poderia não ter sido suficiente para testar essa hipótese (influência do polimorfismo na fibrose avançada).

Nosso estudo apresenta limitações. Os participantes foram recrutados de um único centro médico de atendimento terciário, ligado à Universidade. Os resultados do estudo não podem ser generalizados para todos os pacientes com hepatite C, embora nossa casuística não tenha alta proporção de pacientes com hepatopatia avançada (20,0%). A interpretação dos achados fica limitada também pela falta de grupo de comparação, como pacientes com doença hepática crônica de outra etiologia para ajudar a contextualizar o significado de morbididades dos pacientes com HCV. Além disso, considerando que o desenho do estudo é transversal, não podemos estabelecer com certeza a sequência temporal dos eventos, por exemplo, se o aumento do IMC precedeu a esteatose ou se a atividade necro-inflamatória precedeu a evolução

para fibrose avançada. Estudos longitudinais são os melhores para esclarecer esses pontos.

Por fim, apesar dessas limitações, os resultados obtidos juntam-se às evidências existentes do papel do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 sobre a esteatose hepática e sobre o grau de fibrose em indivíduos com diagnóstico de hepatite C crônica. Até onde sabemos, este é um dos poucos estudos encontrados que analisou pacientes brasileiros com hepatite C sob esse ponto de vista.

Estudos ainda são necessários para esclarecer qual é a melhor abordagem para pacientes com hepatite C crônica em portadores do alelo G do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 que, na sua maioria, são ainda pouco compreendidos, tanto em relação a sua história natural como o melhor tratamento a ser implementado para eles.

6 CONCLUSÕES

- Na população estudada o genótipo mais prevalente do polimorfismo rs738409 foi o CC presente em 45,5% dos participantes do estudo, seguido do genótipo GG (32,6%) e do genótipo CG (21,9%).

- Os fatores de risco associados a esteatose hepática foram: genótipo CG e genótipo GG do polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3, genótipo 3 do HCV, moderada/intensa atividade necro-inflamatória, maior idade, IMC e GGT elevados. Quando considerado o modelo dominante (CC vs CG ou GG), os fatores associados à esteatose hepática foram: genótipo CG do gene PNPLA3, genótipo GG do gene PNPLA3, genótipo 3 do HCV, moderada/intensa atividade necro-inflamatória, maior idade, IMC e GGT elevados. Quando considerado o modelo recessivo (CC ou CG vs GG), os fatores associados à esteatose hepática foram: genótipo 3 do HCV, moderada/intensa atividade necro-inflamatória, maior idade, IMC e GGT elevados, porém não encontramos associação com o genótipo GG do gene PNPLA3 nesse modelo.

- Os fatores de risco associados à fibrose hepática foram: sexo masculino, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa, esteatose hepática, maior idade e níveis elevados de AST. Quando considerado o modelo dominante (CC vs CG ou GG), os fatores associados à fibrose hepática foram: sexo masculino, maior idade, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa e níveis elevados de AST e GGT. Nesse modelo não observamos associação da

fibrose hepática com o genótipo CG ou GG do gene PNPLA3 e com esteatose hepática. Quando considerado o modelo recessivo (CC ou CG vs GG), os fatores associados à esteatose hepática foram: sexo masculino, maior idade, atividade necro-inflamatória moderada ou intensa e níveis elevados de AST e GGT. Não observamos associação de fibrose hepática com o genótipo GG do gene PNPLA3 e com esteatose hepática nesse modelo.

- Observamos associação entre o polimorfismo rs738409 do gene PNPLA3 e esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica, mas essa associação não foi encontrada com fibrose avançada.

ANEXO 1



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 21/10/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0914/09**, intitulado: **"MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS DA HEPATITE C ESTUDO TRANSVERSAL"** apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Fátima Mitfko Tengan**

CAPPesq, 22 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

AQUISIÇÃO DO VÍRUS

17. Ano do primeiro anti-HCV positivo (diagnóstico): () ignorado

18. O senhor teve ou tem alguma atividade no seu trabalho que o coloque em contato com sangue?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 22.

19. Qual o tipo de atividade?

1. Banco de sangue 2. Contato com doentes 3. Farmácia
4. Faz / fez necrópsia 5. Laboratório 6. Outro: _____

20. Já recebeu transfusão de sangue ou plasma (sangue na veia)?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 24.

21. Em que ano (ou há qtos anos) (na primeira vez)? _____

22. Já usou ou usa droga inalada (cheirada)?

1. sim 0. não

Se não, passe para o item 25.

23. Em que ano usou pela primeira vez? _____

24. Em que ano usou pela última vez? _____

25. Já usou ou usa droga injetável?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 28.

26. Em que ano usou droga injetável pela primeira vez? _____

27. Em que ano usou pela última vez? _____

28. O senhor já fez diálise?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 31.

29. Em que ano fez diálise pela primeira vez? _____

30. Em que ano fez diálise pela última vez? _____

31. Já teve hepatite?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 34.

32. Em que ano teve hepatite? _____

33. O senhor sabe o tipo?

1. A 2. B 3. C 4. Outro: ____ 9. não sabe o tipo

34. Já foi internado em hospital?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 37.

35. Quando (ano) o senhor foi internado (pela primeira vez)? _____

36. Qual foi o motivo dessa internação? _____

37. Já fez tratamento dentário?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se não, passe para o item 40.

38. Já fez cirurgia dentária? (ex. canal, implante)

1. sim 0. não 9. Ignorado

39. Em que ano o Sr. fez a cirurgia dentária (a primeira)? _____

40. Já foi operado?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 46.

41. De que o senhor foi operado (na primeira vez)? _____

42. Quantas vezes o senhor foi operado? _____

Se mais de uma vez, passe para o item 44.

43. Em que ano foi operado? _____

44. Em que ano foi operado pela primeira vez? _____

45. Em que ano foi operado pela última vez? _____

46. O senhor já fez tratamento com acupuntura?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 49.

47. Em que ano o senhor fez tratamento com acupuntura pela primeira vez? _____

48. O senhor já fez tatuagem?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 50.

49. Em que ano fez tatuagem pela primeira vez? _____

--	--	--	--

50. Furou a orelha para usar brincos?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 52.

51. Em que ano, na primeira vez? _____

52. Usa ou já usou piercing?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 55.

54. Em que ano (na primeira vez)? _____

55. Alguém de sua família teve ou tem hepatite?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não, passe para o item 58.

56. Em que ano esse familiar teve hepatite? _____

--	--	--	--

57. Qual o tipo de hepatite?

1. A 2. B 3. C 4. Outro: ____ 9. não sabe o tipo

58. O senhor já teve ou tem parceiro com hepatite?

1. sim 0. não 9. ignorado

Se não passe para o item 62.

59. Em que ano vocês se relacionaram pela primeira vez? |_|_|_|_|_|

--	--	--	--

60. Qual o tipo de hepatite?

1. A 2. B 3. C 4. Outro: ____ 9. não sabe o tipo

Preenchimento feito pelo coordenador

Exposição potencial:

Ano:

61. Alguma vez em sua vida, o senhor teve problemas com álcool?

1. sim 0. não

Se não, passe para o item 65.

62. Que tipo de bebida (a mais comum)? _____

64. Quantas vezes por semana? _____

1. sim 0. não

65. Atualmente, o senhor toma algum tipo de bebida que contenha álcool?

1. sim 0. não

Se não, passe para o item 68.

66. Que tipo de bebida (a mais comum) _____

67. Quantas vezes por semana? _____

Preenchimento feito pelo coordenador

Grau de etilismo:

68. Fuma ou já fumou cigarros?

1. sim 0. não

Se não, passe para o item 1.

69. Quantos cigarros o senhor fuma ou fumou por dia? _____ cigarros/dia.

70. Em que ano começou a fumar? _____

71. Em que ano fumou pela última vez? _____

Preenchimento feito pelo coordenador

Exposição ao tabagismo:

DADOS CLÍNICOS 1

1. O senhor já ficou doente alguma vez? (necessitou de cuidados médicos)

1. sim 0. não 9. ignorado

20. Nos últimos 3 meses, necessitou usar colírio mais de 3 vezes ao dia?

1. sim 0. não 9. não sabe

21. Nos últimos 3 meses, sentiu a boca seca com frequência?

1. sim 0. não 9. não sabe

22. Notou se as glândulas parótidas aumentaram, como na caxumba?

1. sim 0. não 9. não sabe

23. Tem dificuldade para engolir ou necessita de água para engolir melhor os alimentos?

1. sim 0. não 9. não sabe

24. O senhor já sentiu dores no peito?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se não, passe para o item 26.

25. Essas dores pioram quando respira fundo?

1. sim 0. não 9. não sabe

26. O senhor já teve trombose (entupimento de veias)?

1. sim 0. não 9. não sabe

27. Já teve derrame (AVC)?

1. sim 0. não 9. não sabe

28. O senhor já teve infarto?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se paciente do sexo masculino, passe para o item 30.

29. A senhora já teve aborto espontâneo?

1. sim 0. não 9. não sabe

30. Dorme bem?

1. sim 0. não 9. não sabe

31. Acorda descansado?

1. sim 0. não 9. não sabe

32. Tem aftas na boca?

1. sim 0. não 9. não sabe

33. Tem feridas (úlceras) na região genital?

1. sim 0. não 9. não sabe

34. Sente coceiras na pele?

1. sim 0. não 9. não sabe

35. Costuma ter manchas/ feridas ou qualquer outro tipo de alteração na pele?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se sexo masculino, passe para o item 38.

36. A senhora faz reposição hormonal?

1. sim 0. Não 8. não se aplica 9. não sabe

37. Qual medicamento usa para reposição hormonal? _____

8. não se aplica 9. ignorado

38. Toma medicamentos para pressão alta?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se não, passe para o item 40.

39. Qual ou quais medicamentos usa para pressão alta? _____

8. não se aplica 9. ignorado

40. Toma medicamentos para Diabetes?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se não, passe para o item 42.

41. Qual ou quais medicamentos usa para Diabetes? _____

8. não se aplica 9. Ignorado

42. Toma medicamento para tireóide?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se não, passe para o item 44.

43. Qual medicamento usa para tireóide? _____

8. não se aplica 9. ignorado

44. Toma medicamentos para controlar o colesterol e/ou triglicérides?

1. sim 0. não 9. não sabe

Se não, passe para o item 1.

45. Qual ou quais medicamentos usa para colesterol e/ou triglicérides? _____

8. não se aplica 9. Ignorado

TRATAMENTO

46. TRATAMENTO1: 0. Não 1. Sim 9. Ignorado

47. Tratamento 1, DROGA (s): _____

8. Não se aplica 9. Ignorado

48. Tratamento 1, INÍCIO: / /

08/08/8888 = Data não se aplica 09/09/9999 = Data ignorada

49. Tratamento 1, FIM: / /

08/08/8888 = Data não se aplica 09/09/9999 = Data ignorada

50. Tratamento 1, INTERRUPÇÃO: / /

08/08/8888 = Data não se aplica 09/09/9999 = Data ignorada

51. RESPOSTA VIROLÓGICA SUSTENTADA1: NÃO SIM NÃO SE APLICA

IGNORADO EM ANDAMENTO

Considerar RVS: RNA HCV negativo até 6 meses após suspensão do tratamento.

52. OBSERVAÇÕES SOBRE O TRATAMENTO1

--

53. Houve alguma doença desencadeada durante ou após o uso do interferon:

0. Não 1. Sim 8. Não se aplica 9. Ignorado

54. Em caso afirmativo, que doença: _____

8. Não se aplica 9. Ignorado

55. Em caso afirmativo, data: / /

8. Não se aplica 9. Ignorado

56. OBSERVAÇÕES SOBRE DOENÇAS DESENCADEADAS PELO INTERFERON:

--

DADOS DE EXAME FÍSICO

57. Pulso /minutos

58. PA x cmHg

59. Peso , Kg

60. Altura , cm

61. Circunferência abdominal . cm

62. Observações

--

ANEXO 3

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – I

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA(grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “IMPACTO DA EXPRESSÃO DO GENE PNPLA3 NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C”

PESQUISADOR: *FÁTIMA MITIKO TENGAN*

CARGO/ FUNÇÃO: *DOCENTE - CHEFE DO LIM 47 - LABORATÓRIO DE HEPATOLOGIA POR VÍRUS DO HC-FMUSP*

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL Nº: 43440

UNIDADE DO HCFMUSP: *LIM 47-DIVISÃO DE CLÍNICA DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS*

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 MESES

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa investigar o porquê de alguns pacientes com hepatite C apresentarem depósito de gordura no fígado.

Para alcançar esse objetivo, vamos estudar algumas características genéticas dos pacientes com hepatite C crônica. Este estudo será realizado no sangue.

Para participar da pesquisa MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS – ESTUDO PROSPECTIVO, seu sangue foi colhido para saber se o vírus da hepatite C estava presente no sangue e o material que sobrou foi guardado em freezer. Para realizar a presente pesquisa, precisamos de sua autorização para fazer os exames no sangue guardado.

Não haverá nenhum desconforto ou risco, pois não haverá nenhum procedimento novo.

A sua colaboração neste estudo é muito importante, pois conhecendo certas características genéticas do paciente com hepatite C crônica, poderemos planejar um esquema de tratamento com mais chances de sucesso. Porém, somente no final do estudo, com os resultados, poderemos concluir pela presença de algum benefício para os pacientes com hepatite C crônica. No momento, não há benefício direto para os participantes.

Em qualquer etapa do estudo, nos próximos 24 meses, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

A principal investigadora é a Dra. Fátima Mitiko Tengan, que pode ser encontrada no LIM 47 (Laboratório de Hepatologia por Vírus), localizado à Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470, sala 12, Cerqueira César. Telefone: 3085-1601. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre aspectos éticos da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

O(a) senhor(a) terá acesso às informações sobre os resultados da pesquisa que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Pretendemos realizar ainda outras pesquisas sobre a caracterização molecular do vírus da hepatite C e as características genéticas do paciente com hepatite C crônica, utilizando sangue que já foi coletado no passado, durante o seu acompanhamento médico.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste sangue em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “IMPACTO DA EXPRESSÃO DO GENE PNPLA3 NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C”.

Eu discuti com a Dra. Fátima Mitiko Tengan sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, a ausência de procedimentos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente/ Representante Legal

Data: ____/____/____

Assinatura da Testemunha*

Data: ____/____/____

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____

ANEXO 4

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO - II

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA(grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "IMPACTO DA EXPRESSÃO DO GENE PNPLA3 NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C"

PESQUISADOR: *FÁTIMA MITIKO TENGAN*

CARGO/ FUNÇÃO: *DOCENTE - CHEFE DO LIM 47 - LABORATÓRIO DE HEPATOLOGIA POR VÍRUS DO HC-FMUSP*

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL Nº: 43440

UNIDADE DO HCFMUSP: *LIM 47-DIVISÃO DE CLÍNICA DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS*

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 MESES

A hepatite C crônica é frequentemente associada à esteatose hepática que acelera a progressão da fibrose hepática e reduz a resposta ao tratamento. Fatores genéticos ligados ao paciente parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da esteatose hepática. Se a predisposição à esteatose hepática é conhecida com antecedência, estratégias para redução da fibrose podem ter efeito benéfico para os pacientes com hepatite C. Este estudo tem como objetivo analisar a influência dos fatores genéticos na presença de esteatose (deposição de gordura no fígado) e grau de fibrose em pacientes com hepatite C crônica.

Neste estudo, será realizada uma entrevista e coletado 1 tubo de sangue de 10 ml por punção da veia do seu antebraço, além dos exames habituais para o seu acompanhamento e/ou tratamento. A entrevista será feita através de questionário, em local reservado e com impressos padronizados. A coleta de sangue será utilizada para analisar seu DNA (fator genético).

A punção venosa pode causar leve desconforto no local, e raramente pode levar a aparecimento de mancha roxa ao redor da picada.

O (a) senhor (a) é livre para responder ou não às perguntas realizadas. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

A sua colaboração neste estudo é muito importante, pois conhecendo certas características genéticas do paciente com hepatite C crônica, poderemos planejar um esquema de tratamento com mais chances de sucesso. Porém, somente ao fim do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes com hepatite C. No momento, não há benefício direto para o participante.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. É garantida a confidencialidade e o sigilo das informações.

O (a) senhor (a) terá acesso às informações sobre os resultados da pesquisa que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação

financeira relacionada à sua participação.

Em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos dessa pesquisa, o (a) senhor (a) terá direito à assistência médica na instituição.

Em qualquer etapa do estudo, nos próximos 24 meses, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

A principal investigadora é a Dra. FÁTIMA MITIKO TENGAN, que pode ser encontrada no LIM 47 (Laboratório de Hepatologia por Vírus), localizado à Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470, sala 12, Cerqueira César. Telefone: 3085-1601. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Telefone: 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

Pretendemos realizar ainda outras pesquisas sobre a caracterização molecular do vírus da hepatite C e as características genéticas do paciente com hepatite C crônica, utilizando sangue que já foi coletado no passado, durante o seu acompanhamento médico.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste sangue em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(.....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “IMPACTO DA EXPRESSÃO DO GENE PNPLA3 NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C”.

Eu discuti com o Dra. FÁTIMA MITIKO TENGAN a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no momento do atendimento neste Serviço.

Assinatura do Paciente/ Representante Legal

Data: ____/____/____

Assinatura da Testemunha*

Data: ____/____/____

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____

ANEXO 5



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: IMPACTO DA EXPRESSÃO DO GENE PNPLA3 NA ESTEATOSE HEPÁTICA EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

Pesquisador Responsável: Fatima Mitiko Tengan

Versão: 1

Pesquisador Executante: Caroline Manchiero

CAAE: 22225213.3.0000.0068

Co-autores: Mariana Cavalheiro MagriCaroline Manchiero

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Orientador: Fatima Mitiko Tengan

Instituição: HCFMUSP

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11397

Número do Parecer: 448.527

Data da Relatoria: 06/11/2013

Apresentação do Projeto: Estudo com casuística retrospectiva e prospectiva de pacientes com hepatite C, virgens de tratamento, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2015. A estimativa da amostra é de 255 pacientes. Considerando a possibilidade de que fatores genéticos do hospedeiro possam contribuir para o desenvolvimento de esteatose hepática, muito frequente em pacientes com Hepatite C, os autores visam avaliar a influência do polimorfismo rs738409, presente no gene da PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain containing 3), na presença de esteatose e de fibrose hepáticas nestes pacientes. Vários autores identificaram o polimorfismo rs738409 na posição 148 do gene PNPLA3 como forte determinante do desenvolvimento da esteatose em portadores do vírus da hepatite C. Serão analisados dados clínicos, laboratoriais e histopatológicos coletados através de entrevista e consultas médicas: dados demográficos: sexo, idade; antropomórficos: peso e altura; fatores de risco para aquisição do vírus da hepatite C; hábitos: etilismo, tabagismo; níveis séricos de HCV RNA (Log IU/ml); genótipos do vírus da hepatite C; testes bioquímicos no soro: glicemia, Insulina, ALT, AST, GGT, Colesterol total e frações, triglicérides e ferritina; estudo histológico de fragmento hepático. A análise do polimorfismo será realizada através da reação em cadeia pela polimerase -análise de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Análise univariada será realizada com o teste χ^2 ou teste exato de Fisher para comparações de valores qualitativos ou teste de Student para valores quantitativos. A associação de esteatose com características selecionadas do paciente (demográficas, epidemiológicas, clínico-laboratoriais e histológicas) e do vírus será avaliada utilizando análise univariada e multivariada (regressão logística não condicional). Não haverá retenção de amostras para armazenamento em Banco.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a frequência relativa do polimorfismo rs738409 presente no gene da PNPLA3 em indivíduos portadores da infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC). Avaliar a influência do polimorfismo rs738409 presente no gene da PNPLA3 na presença de esteatose hepática e no grau de fibrose em pacientes com hepatite C crônica.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5ª andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP,

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

7 REFERÊNCIAS

Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol.* 2005; 132–138.

Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology.* 2001; 33(6):1358-64

Ali M, Yopp A, Gopal P, Beg MS, Zhu H, Lee W, Singal AG. A Variant in PNPLA3 Associated With Fibrosis Progression but not Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis C Virus Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016; 14(2):295-300.

Alter M.J., Kuhnert W.L., Finelli L. Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of antibody to hepatitis C Virus. *MMWR Recomm Rep.* 2003; 52:1-15.

Ampuero J, Del Campo JA, Rojas L, García-Lozano JR, Solá R, Andrade R, Pons JA, Navarro JM, Calleja JL, Buti M, González-Escribano MF, Forns X, Diago M, García-Samaniego J, Romero-Gómez M. PNPLA3 rs738409 causes

steatosis according to viral & IL28B genotypes in hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2014; 13(4):356-63.

Ascione A, Tartaglione MT, Costanzo GGD. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Digestive and Liver Disease.* 2007; 39 (Suppl 1): S4-S7.

Asselah T, Boyer N, Guimont MC, et al. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Gut.* 2003;52:1638–43.

Bach N, Thung SN, Schaffner F. The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic hepatitis: a comparative analysis. *Hepatology.* 1992, 15(4): 572–577.

Baran B1, Gulluoglu M, Soyer OM, Ormeci AC, Gokturk S, Evirgen S, Yesil S, Akyuz F, Karaca C, Demir K, Kaymakoglu S, Besisik F. Treatment failure may lead to accelerated fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2014; 21(2):111-20.

Bellentani S1, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med.* 2000; 132(2):112-7.

Boccatto S1, Pistis R, Noventa F, Guido M, Benvegnù L, Alberti A. Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2006; 13(5):297-302.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 88p.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV). *Int J Med Sci.* 2006; 3(2): 29-34.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004; 40:1387-1395.

Brunt EM, Ramrakhiani S, Cordes BG, Neuschwander-Tetri BA, Janney CG, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease. *Mod Pathol.* 2003;16:49-56.

Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M. Expanding the natural

history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2002; 123:134-140.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005; 48:634-642.

Cai T, Dufour JF, Muellhaupt B, Gerlach T, Heim M, Moradpour D, Cerny A, Malinverni R, Kaddai V, Bochud M, Negro F, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study Group. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MBOAT7, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *J Hepatol*. 2011 Sep; 55(3):529-35.

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38(1):41-49.

Castéra L, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut*. 2003; 52(2):288-92.

Cavalheiro NP. Diagnóstico laboratorial da hepatite viral C. In: Araújo ESA, Barone AA. *Hepatite C*. São Paulo. Editora Manole, 2010. p. 76-90.

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

Cuevas JM, Gonzalez M, Torres-Puente M, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, Garcia-Robles I, González-Candelas F, Moya A. The role of positive selection in hepatitis C virus. *Infect Genet Evol*. 2009 Sep;9(5):860-6.

Davis JN, Lê KA, Walker RW, Vikman S, Spruijt-Metz D, Weigensberg MJ, Allayee H, Goran MI. Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92:1522-1527.

Dongiovanni P, Anstee QM, Valenti L. Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des*. 2013; 19:5219-5238.

Dutta AK. A New PCR-RFLP Method for Diagnosing PNPLA3 rs738409 Polymorphism. *Webmed Central GENETICS*. 2012; 3(7):1-6.

Fan JH1, Xiang MQ2, Li QL3, Shi HT1, Guo JJ1. PNPLA3 rs738409 Polymorphism Associated with Hepatic Steatosis and Advanced Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C Virus: A Meta-Analysis. *Gut Liver*. 2016 May 23; 10(3):456-63.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S99-S112.

Fartoux L, Chazouille`res O, Wendum D, Poupon R, Serfaty L.. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C. *Hepatology*. 2005, 41:82-87.

Fried MW¹, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002; 347(13):975-82.

Focaccia R, Baraldo DCM, Ferraz MLG, Martinelli ALC, Carrilho FJ, Gonçales Jr FL, Pedroso MLA, Coelho HSM, Lacerda MA, Brandão CE, Mattos AA, Lira LGC, Zamin Jr I, Pinheiro JOP, Tovo CV, Both CT, Soares JAS, Dittrich S. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz J Infect Dis [online]*. 2004, 8(5):348-355.

Gayotto LCC, Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das Hepatites crônicas. Projeto do Clube de Patologia Hepática da Sociedade Brasileira de Patologia aprovado pela Sociedade Brasileira de Patologia. *Ged*. 2000; 19:137-140.

GeneCards. PNPLA3 gene. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PNPLA3>. Acesso em: 12 de novembro de 2014.

Ghany MG¹, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, Herion D, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003; 124(1):97-104.

Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of Hepatitis C Virus Genotype by Direct Sequence Analysis of Products Generated with the Amplicor HCV Test. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(8):2625-2630.

Giudice EM, Grandone A, Cirillo G, Santoro N, Amato A, Brienza C, Savarese P, Marzuillo P, Perrone L. The association of PNPLA3 variants with liver enzymes in childhood obesity is driven by the interaction with abdominal fat. *PLoS One*. 2011; 6:e27933.

He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*. 2010; 285:6706-6715.

Hosme DW, e Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2a. ed., 2000, New York: Wiley. 320p.

Hotta K, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A. Association of the rs738409 polymorphism in

PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet.* 2010, 11:172.

Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology.* 1999; 29:1215-1219.

Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology.* 2003; 125 (6):1695-704.

Huang CF, Dai CY, Yeh ML, Huang CI, Tai CM, Hsieh MH, Liang PC, Lin YH, Hsieh MY, Yang HL, Huang JF, Lin ZY, Chen SC, Yu ML, Chuang WL. Association of diabetes and PNPLA3 genetic variants with disease severity of patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014; 62(3):512-8.

Hwang SJ, Luo JC, Chu CW, et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C virus infection: Prevalence and clinical correlation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16:190-5.

Juurinen L, Tiikkainen M, Hakkinen AM, Hakkarainen A, Yki-Jarvinen H. Effects of insulin therapy on liver fat content and hepatic insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Mar;292(3):E829-35.

Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol.* 2008, 49:634–651.

Kawai Y, Ikeda M, Abe KI, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Development of a hepatitis C virus relapse model using genome-length hepatitis C virus ribonucleic acid-harboring cells possessing the interferon- α -resistance phenotype. *Society of Hepatology.* 2009; 01-11.

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essentials Medical Statistics.* 2nd Edition, 2006. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005; 41:1313-1321.

Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, et al. A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet.* 2012; 47:116-119.

Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, et al. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia.* 2009; 52:1056-1060.

Kumari, M., Schoiswohl, G., Chitraju, C., Paar, M., Cornaciu, I., Rangrez, A. Y., et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metabolism*. 2012, 15(5):691–702.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2001; 345:41-52.

Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009; 29: 74–81.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17:107-115.

Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, Adinolfi LE, Asselah T, Jonsson JR, Smedile A, Terrault N, Paziienza V, Giordani MT, Giostra E, Sonzogni A, Ruggiero G, Marcellin P, Powell EE, George J, Negro F. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a metaanalysis of individual patient data. *Gastroenterology*. 2006; 130:1636–1642.

Loomba R, Sanyal, AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2013, 10:686–690.

Manns M, Pol S, Jacobson IM, et al. All-oral daclatasvir plus asunaprevir for hepatitis C virus genotype 1b: a multinational, phase 3, multicohort study. *Lancet*. 2014;384(9954):1597–605.

Makkonen J, Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Yki-Järvinen H. Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol.* 2009; 50:1035-1042.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001; 50:1844-1850.

Marra, F., Gastaldelli, A., Svegliati Baroni, G., Tell, G. & Tiribelli, C. Molecular basis and mechanisms of progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Trends Mol. Med.* 2008; 14:72–81.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathologic severity. *Gastroenterology.* 1999; 116:1413–1419.

McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS; IDEAL Study Team. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med.* 2009; 361(6):580-93.

Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat.* 2002; 09:84-100.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology.* 2015; 61(1):77-87.

Mihm S, Fayyazi A, Hartmann H, et al. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology.* 1997; 25:735-9.

Miyashita M1, Ito T, Sakaki M, Kajiwara A, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H, Imawari M. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2012; 19(9):608-14.

Moorman AC, Xu F, Tong X, et al. Mortality and progression to decompensated cirrhosis in chronic hepatitis C patients with liver biopsy confirmed fibrosis in the Chronic Hepatitis Cohort Study (CHeCS). American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Liver Meeting. Boston, November 7-12, 2014. Abstract 174.

Moriya K1, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol.* 1997; 78(7):1527-31.

Morio R, Imamura M, Kawakami Y, Morio K, Kobayashi T, Yokoyama S, Kimura Y, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Nelson Hayes C, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Mori N, Takaki S, Tsuji K, Chayama K. Safety and efficacy of dual therapy with daclatasvir and asunaprevir for older patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2016 Sep 8. [Epub ahead of print].

Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Metaanalysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*. 2011; 43:617-649.

Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Jiang X, Wu S, Yokosuka O. No correlation between PNPLA3 rs738409 genotype and fatty liver and hepatic cirrhosis in Japanese patients with HCV. *PLoS One*. 2013; 8(12):e81312.

Nakaoka K, Hashimoto S, Kawabe N, Nitta Y, Murao M, Nakano T, Shimazaki H, Kan T, Takagawa Y, Ohki M, Kurashita T, Takamura T, Nishikawa T, Ichino N, Osakabe K, Yoshioka K. PNPLA3 I148M associations with liver carcinogenesis in Japanese chronic hepatitis C patients. *Springerplus*. 2015; 4:83.

Patton HM1, Patel K, Behling C, Bylund D, Blatt LM, Vallée M, Heaton S, Conrad A, Pockros PJ, McHutchison JG. The impact of steatosis on disease progression and early and sustained treatment response in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2004; 40(3):484-90.

Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology*. 1998; 27:1700–1702.

Pawlotsky, JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004; 12(2):96-102.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004; 39(1):5-19.

Pereira LMMB, Martelli CMT, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MRA, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima MLC, Alencar LCA, Costa M, Santos AA, Ximenes RAA. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*. 2013; 13:60.

Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Ståhlman M, Taskinen MR, Orho-Melander M, Perman J, Pujia A, Andersson L, Maglio C, Montalcini T, Wiklund O, Borén J, Romeo S. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol*. 2012; 57:1276-1282.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *The Lancet*. 1997; 349:825-832.

Poynard T, Ratzliff V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol*. 2001 May;34(5):730-9.

Poynard T, Ratzliff V, McHutchison J, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38:75–85.

Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008; 40:1461-1465.

Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, et al. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010; 52:894–903.

Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol*. 2000; 33:106–15.

Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S et al. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut*. 2004; 53(3):406–412.

Rüeger S, Bochud PY, Dufour JF, Müllhaupt B, Semela D, Heim MH, Moradpour D, Cerny A, Malinverni R, Booth DR, Suppiah V, George J, Argiro L, Halfon P, Bourlière M, Talal AH, Jacobson IM, Patin E, Nalpas B, Poynard T, Pol S, Abel L, Kutalik Z, Negro F. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut*. 2015; 64(10):1605-15.

Ryder SD, Irving WL, Jones DA, et al. Trent Hepatitis C Study Group. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study, *Gut*. 2004;53:451–5.

Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang*. 1999; 76:149–158.

Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, et al. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology*. 2010;52:1189-1182.

Santoro N, Savoye M, Kim G, Marotto K, Shaw MM, Pierpont B, Caprio S. Hepatic fat accumulation is modulated by the interaction between the rs738409 variant in the PNPLA3 gene and the dietary omega6/omega3 PUFA intake. *PLoS One*. 2012; 7: e37827.

Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. *Hepatology*. 1992, 15(4):567–571.

Seeff, LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26:21S–28S.

Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:s35–s46.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ: Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005, 5(9):558–567.

Simmonds P, Smith D, McOmish F, Yap P, Kolberg J, Urdea M, Holmes E. Identification of Genotypes of Hepatitis C Virus by Sequence Comparisons in the Core, E1 and NS-5 Regions. *J. Gen. Virol*. 1994; 75(5):1053-1061.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.-M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L. J., Thiel, H.-J., Viazov, S., Weiner, A. J. and Widell, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005; 42:962–973.

Sookoian S, Castano GO, Burgueno AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res*. 2009; 50:2111-2116.

Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148 M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2011; 53:1883–1894.

Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Consortium G, et al. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic NAFLD but not metabolic disease. *Hepatology*. 2010; 52:904–912.

Stattermayer AF, Rutter K, Beinhardt S, Wrba F, Scherzer TM, Strasser M, Hofer H, Steindl-Munda P, Trauner M, Ferenci P. Role of FDFT1 polymorphism for fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2014;34:388-395.

Strauss E. Hepatitis C. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(1):69-82.

Strauss E. Historia Natural, Fatores de Progressão, Avaliação prognóstica da HCV crônica. In: Focaccia, R. *Tratado das Hepatites Virais*. São Paulo. Editora Atheneu; 2003. Cap. 4.6, p.231-45.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2259–2266.

Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2005; 288(2): E462-E468.

Tamaki N1, Kurosaki M1, Higuchi M1, Takada H1, Nakakuki N1, Yasui Y1, Suzuki S1, Tsuchiya K1, Nakanishi H1, Itakura J1, Takahashi Y1, Ogawa S2, Tanaka Y2, Asahina Y3, Izumi N1. Genetic Polymorphisms of IL28B and PNPLA3 Are Predictive for HCV Related Rapid Fibrosis Progression and Identify Patients Who Require Urgent Antiviral Treatment with New Regimens. *PLoS One*. 2015; 10(9):e0137351.

Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 117(2):49-65.

The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1994; 20:15–20.

Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. The Natural History of Hepatitis C Virus Infection: Host, Viral, and Environmental Factors. *JAMA*. 2000; 284(4):450-456.

Thomas DL, Seeff LB. Natural History of Hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*. 2005; 9:383-398.

Trepo E, Pradat P, Potthoff A, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011; 54(1):60–69.

Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, Nobili V, Mozzi E, Roviario G, Vanni E, Bugianesi E, Maggioni M, Fracanzani AL, Fargion S, Day CP. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010; 51:1209–1217.

Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Rametta R, Colombo M, Fargion S. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011; 53(3):791-9.

Valenti L, Motta BM, Soardo G, Bertelli C, Sangiovanni A, et al. I148M PNPLA3 polymorphism is associated with clinical features in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2012; 56: S129.

Wang X, Liu Z, Wang K, Wang Z, Sun X, Zhong L, Deng G, Song G, Sun B, Peng Z, Liu W. Additive Effects of the Risk Alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on

Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in a Chinese Population. *Front Genet.* 2016, 2;7:140.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology.* 2014; 61:S58-S68.

Westin J, Nordlinder H, Lagging M, et al. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol.* 2002;37:837-42.

Westin J, Lagging M, Dhillon AP, Norkrans G, Romero AI, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Schalm SW, Verheij-Hart E, Negro F, Missale G, Neumann AU, Hellstrand K; DITTO-HCV Study Group. Impact of hepatic steatosis on viral kinetics and treatment outcome during antiviral treatment of chronic HCV infection. *J Viral Hepat.* 2007 Jan; 14(1):29-35.

Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96:2957-2961.

World Health Organization - WHO. Hepatite C. Atualizado Abril de 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2015.

Xia J, Xin L, Zhu W, Li L, Li C, Wang Y, Um Y, Yang S, Li K. Characterization of long noncoding RNA transcriptome in highenergy diet induced nonalcoholic steatohepatitis minipigs. *Scientific Reports*. 2016; 1-11.

Xia MF, Ling Y, Bian H, Lin HD, Yan HM, Chang XX, Li XM, Ma H, Wang D, Zhang LS, Wang SS, Wu BJ, He WY, Zhao NQ, Gao X. I148M variant of PNPLA3 increases the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease caused by obesity and metabolic disorders. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016; 43(5):631-42.

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007; 45: 1366-1374.

Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;23(6):1334-40.

Yasui k, Kawaguchi T, Shima T, Mitsuyoshi H, Seki K, Sendo R, Mizuno M, Itoh Y, Matsuda F, Okanou T. Effect of PNPLA3 rs738409 variant (I148 M) on hepatic steatosis, necroinflammation, and fibrosis in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2015;50(8):887-93.

Yuan X, Waterworth D, Perry JR, Lim N, Song K, Chambers JC, Zhang W, Vollenweider P, Stirnadel H, Johnson T, Bergmann S, Beckmann ND, Li Y, Ferrucci L, Melzer D, Hernandez D, Singleton A, Scott J, Elliott P, Waeber G, Cardon L, Frayling TM, Kooner JS, Mooser V. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet.* 2008; 83:520-528.

Zampino R, Coppola N, Cirillo G, Boemio A, Pisaturo M, Marrone A, Macera M, Sagnelli E, Perrone L, Adinolfi LE, Miraglia del Giudice E. Abdominal fat interacts with PNPLA3 I148M, but not with the APOC3 variant in the pathogenesis of liver steatosis in chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis.* 2013; 20:517–523.

Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(2):223-235.