Thamiris Vaz Gago Prata

Alterações genéticas no gene MTTP e sua relação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica

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. Mariana Cavalheiro Magri

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Prata, Thamiris Vaz Gago

Alterações genéticas no gene MTTP e sua relação
com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose
hepática em pacientes com hepatite C crônica /
Thamiris Vaz Gago Prata. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Mariana Cavalheiro Magri.

Descritores: 1.Hepatite C crônica 2.Polimorfismo
de nucleotídeo único 3.Fígado gorduroso 4.Lipídeos
5.Frequência do gene 6.Hepacivirus

USP/FM/DBD-503/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a toda minha família pelo apoio incondicional que sempre demonstraram. Aos meus pais por me incentivarem e proporcionarem todas as condições possíveis para eu nunca parar de estudar. À minha irmã, minha companheira de vida, sempre se dispôs a me ajudar. Ao meu namorado, por ser meu suporte em todos os momentos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço em especial à Dra. Mariana Cavalheiro Magri, minha orientadora e amiga, por todas as oportunidades concedidas, pela confiança, paciência e por tantos ensinamentos dados desde o aprimoramento. Respeito e admiro o seu profissionalismo, assim como tenho uma imensa admiração pela pessoa que você é. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Fátima Mitiko Tengan, pelo auxílio e por todos os ensinamentos ministrados durante esses anos. Sempre disposta a examinar os resultados, com grande participação nesse trabalho. Em especial, agradeço a supervisão no Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Agradeço aos Professores Dr. Edson Abdala, Dra. Gerusa Maria Figueiredo e Dr. José Eduardo Levi pelas sugestões e contribuições durante o exame de qualificação que ajudaram a enriquecer esse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Alci Barone, exemplo de professor, pelo apoio e disponibilidade.

Agradeço as amigas Anny Ayumi Iogi, Arielle Karen da Silva Nunes, Bianca Peixoto Dantas, Caroline Manchiero, Dayane de Souza Rodrigues da Silva e Grayce Mendes Alves por toda a ajuda nesse trabalho, por todos os momentos alegres e pelo convívio nesses anos.

Agradeço ao Dr. Celso Carmo Mazza, por todos os ensinamentos e momentos de descontração no Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP.

Agradeço a todos os funcionários do Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP pela colaboração.

Agradeço ao Laboratório de Investigação Médica em Micologia (LIM-53), em especial à Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro por toda contribuição.

Agradeço o Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a todos os funcionários e professores, em especial à Roseli Antônia Santo por todo o suporte acadêmico.

Agradeço à Profa. Dra. Marta Heloisa Lopes pela supervisão no Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Agradeço à Letícia, secretária da disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da graduação em medicina por auxiliar no Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Agradeço a todos os meus amigos e os amigos que fiz durante o Mestrado pelo carinho e apoio.

APOIO FINANCEIRO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP):
Processo 2016/19690-5.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES):
Código de Financiamento 001.
- Laboratório de Hepatologia por Vírus (LIM-47) do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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 Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Figuras e Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1 Hepatite C	1
1.1.1 Agente etiológico	1
1.1.2 Diagnóstico	2
1.1.3 Tratamento	3
1.1.4 Epidemiologia	5
1.1.5 Distribuição geográfica dos genótipos	6
1.1.6 Transmissão	6
1.1.7 História natural da infecção	7
1.1.8 Fatores que influenciam a evolução da hepatite C crônica	9
1.2 Esteatose hepática na hepatite C crônica	10
1.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica	11
1.4 MTTP (<i>microsomal triacylglycerol transfer protein</i> - proteína de transferência de triglicerídeo microssomal)	13
1.4.1 Polimorfismos no gene MTTP	14
1.4.2 Polimorfismos no gene MTTP e sua relação com a DHGNA	16
1.4.3 Polimorfismos no gene MTTP e sua relação com a hepatite C	17
2. Objetivos	20
3. Métodos	21
3.1 Casuística	22
3.1.1 Aspectos éticos	22
3.2 Avaliação clínica, laboratorial e histológica	23
3.3 Métodos laboratoriais	25
3.3.1 Extração e purificação de DNA	25
3.3.2 Genotipagem dos polimorfismos no gene MTTP	26

3.3.2.1 Polimorfismo -164T/C (rs1800804) no gene MTTP	30
3.3.2.2 Polimorfismo -400A/T (rs1800803) no gene MTTP	32
3.3.2.3 Polimorfismo H297Q (rs2306985) no gene MTTP	35
3.4 Análise dos dados coletados	37
4. Resultados	39
4.1 Características gerais	39
4.2 Fatores associados à esteatose hepática	42
4.3 Genotipagem dos polimorfismos no gene MTTP	45
4.4 Fatores avaliados em relação ao polimorfismo -164T/C no gene MTTP	50
4.5 Fatores avaliados em relação ao polimorfismo -400A/T no gene MTTP	62
4.6 Fatores avaliados em relação ao polimorfismo H297Q no gene MTTP	74
4.7 Representação gráfica dos principais achados	86
5. Discussão	89
6. Conclusões	97
7. Anexos	99
8. Referências Bibliográficas	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
ALT	Alanina aminotransferase
ApoB	Apolipoproteína B
ApoC3	Apolipoproteína C 3
ApoE	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
C	Citosina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
DAAs	<i>Direct-acting antivirals</i> – Antivirais de ação direta
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
dL	Decilitro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática
et al	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
GGT	Gama glutamil transferase
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> – Vírus da hepatite B
HCC	Hepatocarcinoma
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> – Vírus da hepatite C
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IFNL3	Interferon lambda 3
IFNL4	Interferon lambda 4

IL28B	Interleucina 28 B
IMC	Índice de massa corporal
kDa	Kilodalton
Kit	Conjunto de reagentes
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LIM-47	Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus
mg	Miligrama
min	Minuto/minutos
mL	Mililitro/mililitros
MTTP	<i>Microsomal triacylglycerol transfer protein</i> – Proteína de transferência de triglicerídeo microssomal
n	Número de amostras
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NR1I2	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> – Fase aberta de leitura
p	Nível de significância estatística
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
Peg-IFN α	<i>Pegylated interferon alpha</i> – Interferon alfa peguilado
PEMT	<i>Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase</i>
pmol	Picomol
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain containing protein 3</i>
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor α</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> – Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RIBA	<i>Recombinant immunoblot assay</i> – Ensaio de imunotransferência recombinante
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RVS	Resposta virológica sustentada
seg	Segundo/segundos
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de nucleotídeo único

SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TBE	Tris-Borato EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TM6SF2	<i>Transmembrane six superfamily member 2</i>
U	Unidade
UTR	<i>Untranslated region</i> – Região não traduzida
UV	Luz ultravioleta
V	Volts
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de densidade muito baixa
vs	<i>Versus</i>
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
∞	Infinito
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
3′	Região carboxi-terminal do ácido nucléico
5′	Região amino-terminal do ácido nucléico

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Estrutura genômica e proteínas do HCV	1
Figura 2 - Árvore filogenética do HCV	2
Figura 3 - Localização do gene MTTP	14
Figura 4 - Mapa de restrição enzimática de sequência do gene MTTP (número de acesso no GenBank: NG_011469) A) Mapa da sequência completa de 220 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 18 ao 77, destacando a posição de corte (nucleotídeo 50) da enzima de restrição <i>BsrI</i>	32
Figura 5 - Mapa de restrição enzimática de sequência do gene MTTP (número de acesso no GenBank: NG_011469) A) Mapa da sequência amplificada de 837 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 312 ao 371, destacando a posição de corte (nucleotídeo 343) da enzima de restrição <i>SspI</i>	35
Figura 6 - Mapa de restrição enzimática de sequência do gene MTTP (número de acesso no GenBank: NG_011469). A) Mapa da sequência completa de 231 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 138 ao 197, destacando a posição de corte (nucleotídeo 170) da enzima de restrição <i>BsrI</i>	37
Figura 7 - Análise do produto amplificado na PCR para genotipagem do polimorfismo -164T/C no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o padrão de peso molecular de 50 pb; banda de 220 pb de cada amostra	45
Figura 8 - Análise do produto amplificado na PCR para genotipagem do polimorfismo -400A/T no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o padrão de peso molecular de 100 pb; banda de 838 pb de cada amostra	45
Figura 9 - Análise do produto amplificado na PCR do polimorfismo H297Q no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o padrão de peso molecular de 50 pb; banda de 231 pb de cada amostra	46
Figura 10 - Análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado de 220 pb do polimorfismo -164T/C no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o marcador de peso molecular de 50 pb e os três perfis da RFLP	47
Figura 11 - Análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado de 838 pb do polimorfismo -400A/T no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o marcador de peso molecular de 100 pb e os três perfis da RFLP	48

Figura 12 - Análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do 49
produto amplificado de 231 pb do polimorfismo H297Q no gene MTTP. Gel de agarose a
3% mostrando o marcador de peso molecular de 50 pb e os três perfis da RFLP

Gráfico 1 - Distribuição dos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo os genótipos de 50
cada SNP estudado

Gráfico 2 - Representação gráfica da frequência dos pacientes com esteatose hepática e 87
com os genótipos do polimorfismo -164T/C no gene MTTP em relação ao genótipo do HCV

Gráfico 3 - Representação gráfica da frequência dos pacientes com esteatose hepática e 87
com os genótipos do polimorfismo -164T/C no gene MTTP em relação ao nível plasmático
de GGT

Gráfico 4 - Representação gráfica da frequência dos pacientes com esteatose hepática e 88
com os genótipos do polimorfismo -400A/T no gene MTTP em relação ao genótipo do HCV

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referência considerados alterados dos exames laboratoriais realizados nos pacientes com hepatite C crônica incluídos no estudo	24
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de amplificação (PCR) do gene MTTP e tamanho do fragmento amplificado	27
Tabela 3 - Protocolo dos ensaios de PCR com volume final de 16,7 µL para detecção dos polimorfismos no gene MTTP	28
Tabela 4 - Enzimas de restrição utilizadas na técnica de RFLP para a genotipagem dos polimorfismos no gene MTTP	29
Tabela 5 - Protocolo do ensaio de PCR para amplificação do fragmento de 220 pb para a genotipagem do SNP -164T/C no gene MTTP de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP	31
Tabela 6 - Protocolo do ensaio de RFLP para a genotipagem dos polimorfismos -164T/C e H297Q de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP	31
Tabela 7 - Protocolo do ensaio de PCR para amplificação do fragmento de 838 pb para a genotipagem do SNP -400A/T no gene MTTP de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP	33
Tabela 8 - Protocolo do ensaio de RFLP para a genotipagem do polimorfismo -400A/T de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP	34
Tabela 9 - Protocolo do ensaio de PCR para amplificação do fragmento de 231 pb para a genotipagem do SNP H297Q no gene MTTP de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP	36
Tabela 10 - Distribuição dos 236 pacientes incluídos no estudo segundo sexo, faixa etária, IMC e comorbidades	39
Tabela 11 - Distribuição dos 236 pacientes segundo antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do vírus da hepatite C, etilismo e tabagismo	40
Tabela 12 - Distribuição dos 236 participantes do estudo segundo exames laboratoriais	41
Tabela 13 - Distribuição dos 236 pacientes segundo características do vírus da hepatite C	41
Tabela 14 - Distribuição dos 236 pacientes segundo características anatomopatológicas encontradas em fragmento hepático	42

Tabela 15 - Fatores associados à esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica	43
Tabela 16 - Análise multivariada dos fatores associados à presença de esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica	44
Tabela 17 - Frequência encontrada do alelo mutado de cada SNP nos 236 pacientes incluídos no estudo e resultado do teste estatístico para o equilíbrio de Hardy-Weinberg	50
Tabela 18 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo modelo co-dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação	51
Tabela 19 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação	53
Tabela 20 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação	55
Tabela 21 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo modelo co-dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação	57
Tabela 22 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação	58
Tabela 23 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação	59
Tabela 24 - Descrição dos graus de esteatose hepática segundo o modelo co-dominante, modelo dominante e modelo recessivo do polimorfismo -164T/C	60
Tabela 25 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo -164T/C no modelo dominante (TT vs TC/CC)	61
Tabela 26 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo -164T/C com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica	62
Tabela 27 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C	63

crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação

Tabela 28 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação 65

Tabela 29 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação 67

Tabela 30 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação 69

Tabela 31 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação 70

Tabela 32 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação 71

Tabela 33 - Descrição dos graus de esteatose hepática segundo o modelo co-dominante, modelo dominante e modelo recessivo polimorfismo -400A/T 72

Tabela 34 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo -400A/T no modelo dominante (AA vs AT/TT) 73

Tabela 35 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo -400A/T com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica 74

Tabela 36 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação 75

Tabela 37 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação 77

Tabela 38 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de 79

associação

Tabela 39 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com 81
hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo H297Q e resultado
dos testes de associação

Tabela 40 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 participantes do 82
estudo segundo o modelo dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de
associação

Tabela 41 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 participantes do 83
estudo segundo o modelo recessivo do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de
associação

Tabela 42 - Descrição dos graus de esteatose hepática segundo o modelo co-dominante, 84
modelo dominante e modelo recessivo polimorfismo H297Q

Tabela 43 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o 85
polimorfismo H297Q no modelo dominante (HH vs HQ/QQ)

Tabela 44 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo 86
H297Q com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose
hepática em pacientes com hepatite C crônica

RESUMO

Prata TVG. *Alterações genéticas no gene MTTP e sua relação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A progressão da hepatite C crônica para fibrose hepática envolve diversos fatores, entre os fatores metabólicos destaca-se a esteatose hepática. A esteatose hepática na infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é complexa e envolve fatores virais e do hospedeiro. Alguns polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) parecem influenciar as concentrações dos lipídeos plasmáticos e o desenvolvimento da esteatose hepática em pacientes com HCV. **Objetivo:** Detectar e avaliar a influência dos SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q no gene da proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP) na esteatose hepática e nos níveis de lipídeos plasmáticos em pacientes com hepatite C crônica. **Métodos:** Os SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q foram genotipados em 236 pacientes com hepatite C crônica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A genotipagem foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase seguida de análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), na qual após a amplificação de um fragmento específico do DNA foi realizada a digestão por enzimas de restrição e as bandas referentes a cada genótipo foram visualizadas em gel de agarose. Foi avaliada a associação de características com os genótipos de cada SNP em diferentes modelos genéticos (co-dominante, dominante e recessivo). Foram realizadas análises estatísticas bivariadas e multivariadas com o auxílio do programa IBM-SPSS. **Resultados:** No presente estudo, 56,4% dos participantes eram mulheres e a média de idade foi 55,5 anos (29-83 anos). O genótipo mais prevalente do SNP -164T/C foi o homozigoto selvagem (TT) e dos SNPs -400A/T e H297Q foram os heterozigotos (AT e HQ, respectivamente). As frequências dos alelos mutados dos SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q foram de 0,30, 0,41 e 0,50, respectivamente. As distribuições genotípicas dos três SNPs no gene MTTP

estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O alelo mutado do SNP -164T/C foi associado com idade avançada, presença de hipertensão arterial, níveis elevados de ferro, ferritina e insulina ($p < 0,05$). Sendo que o nível elevado de insulina foi associado com o SNP -164T/C nos três modelos genéticos estudados. O alelo mutado do SNP -400A/T foi associado com diabetes ($p = 0,005$) e o alelo selvagem com siderose ($p = 0,030$) nos modelos genéticos co-dominante e dominante. O alelo mutado do SNP H297Q foi associado com o genótipo 3 do HCV (modelo co-dominante), presença de hipertensão arterial (modelos co-dominante e dominante) e nível elevado de insulina (modelo dominante) ($p < 0,05$). Nenhum dos SNPs foi associado com alterações nos níveis de lipídeos e com os diferentes graus de esteatose hepática. A presença do alelo mutado do SNP -164T/C em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV, foi associada na análise multivariada com a esteatose ($p = 0,004$). Ainda em relação ao SNP-164T/C, o nível elevado de GGT em conjunto com a presença do alelo mutado foi associado com a esteatose ($p = 0,006$). A presença do alelo mutado do SNP -400A/T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV, também foi associada com a esteatose ($p = 0,032$). A análise do SNP H297Q em conjunto com as características avaliadas não apresentou associação com a esteatose ($p > 0,05$). **Conclusões:** Foi detectada a presença de todos os genótipos dos SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP e não foram associados com alterações nos níveis de lipídeos. A esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica foi associada com os SNPs -164T/C e -400A/T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV, e com o SNP -164T/C em conjunto com elevação no nível de GGT. Portanto, em pacientes com hepatite C crônica, as características do hospedeiro e do vírus podem ser investigadas em conjunto.

Descritores: hepatite C crônica; polimorfismo de nucleotídeo único; fígado gorduroso; lipídeos; frequência do gene; hepacivírus.

ABSTRACT

Prata TVG. *Genetic alterations in the MTTP gene and relation with plasma lipid levels and hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Introduction: The chronic hepatitis C progression to liver fibrosis involves several factors; among the metabolic factors, hepatic steatosis is observed. Hepatic steatosis in hepatitis C virus (HCV) infection is complex, involves both viral and host factors. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) seem to influence the plasma lipid concentrations and the development of hepatic steatosis in HCV patients. **Objective:** Detect and evaluate the influence of the -164T/C, -400A/T, and H297Q SNPs in the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene on hepatic steatosis and plasma lipid levels in patients with chronic hepatitis C. **Methods:** The -164T/C, -400A/T and H297Q SNPs were genotyped in 236 patients with chronic hepatitis C of the Clinical Hospital of the School of Medicine, University of Sao Paulo. Genotyping was performed by the polymerase chain reaction assay followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, in which after the amplification of a specific DNA fragment, digestion was performed by restriction enzymes and each genotype bands were visualized on agarose gel. Several characteristics were evaluated with the genotypes of each SNP in different genetic models (co-dominant, dominant and recessive). Bivariate and multivariate statistical analyzes were performed using the software IBM-SPSS. **Results:** In the present study, 56.4% of the participants were women and the mean age was 55.5 years (29-83 years). The most prevalent genotype of the -164T/C SNP was the wild-type homozygous (TT) and the -400A/T and H297Q SNPs were the heterozygous (AT and HQ, respectively). The frequencies of mutated alleles in the -164T/C, -400A/T and H297Q SNPs were 0.30, 0.41 and 0.50, respectively. The genotype distributions of three SNPs in the MTTP gene were in Hardy-Weinberg equilibrium. The mutated allele of the -164T/C SNP was associated with advanced age, presence of arterial hypertension, elevated levels of iron, ferritin and insulin ($p < 0.05$). The elevated insulin level was

associated with the SNP -164T/C in the three genetic models studied. The mutated allele of the -400A/T SNP was associated with diabetes ($p=0.005$) and the wild-type allele with siderosis ($p=0.030$) in co-dominant and dominant genetic models. The mutated allele of H297Q SNP was associated with HCV genotype 3 (co-dominant model), presence of arterial hypertension (co-dominant and dominant models) and elevated insulin level (dominant model) ($p<0.05$). None of the SNPs were associated with alterations in lipid levels and with hepatic steatosis distinct degrees. The presence of mutated allele of the -164T/C SNP combined with HCV genotype 3 infection was associated in the multivariate analysis with steatosis ($p=0.004$). Also with regard to -164T/C SNP, elevated levels of GGT combined with the presence of the mutated allele were associated with steatosis ($p=0.006$). The presence of the mutated allele of the -400A/T SNP combined with HCV genotype 3 infection was also associated with steatosis ($p=0.032$). The analysis of the H297Q SNP combined with the characteristics evaluated was not associated with steatosis ($p>0.05$).

Conclusions: The presence of all genotypes of the -164T/C, -400A/T and H297Q SNPs in the MTTP gene was detected and was not associated with alterations in lipid levels. Hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C was associated with the -164T/C and -400A/T SNPs combined with HCV genotype 3 infection, and with the -164T/C SNP combined with elevated GGT level. Therefore, in patients with chronic hepatitis C, host and virus characteristics can be investigated in combination.

Descriptors: hepatitis C, chronic; polymorphism, single nucleotide; fatty liver; lipids; gene frequency; hepacivirus.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hepatite C

A hepatite C é reconhecida atualmente como a maior causa de doença hepática crônica no mundo, é uma doença progressiva, caracterizada por uma inflamação hepática persistente ocasionada pelo vírus da hepatite C (HCV) (Lee et al., 2014; Westbrook; Dusheiko, 2014). O HCV possui distribuição mundial, o que torna a infecção por esse vírus um problema de saúde global. O vírus está disseminado entre pessoas de todas as idades, gêneros e raças (Lavanchy, 2011; Hajarizadeh et al., 2013).

1.1.1 Agente etiológico

O HCV foi identificado em 1989 por Choo et al., é um vírus envelopado e pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (Choo et al., 1989). O RNA genômico do HCV é de fita simples de sentido positivo, e contém regiões não codificadoras de proteínas nas suas extremidades, uma região 5'UTR (*untranslated region*) e uma região 3'UTR, que delimitam uma longa fase aberta de leitura (ORF) com mais de 9.000 nucleotídeos. A região 5'UTR é a região mais conservada do genoma do vírus, enquanto as regiões que codificam as proteínas, em especial as proteínas do envelope (E1, E2) são as mais variáveis. Assim, a região 5'UTR é geralmente o alvo de escolha para detecção do genoma do HCV e seus diferentes genótipos (Li; Lo, 2015). Após a tradução ribossômica da região codificante, são produzidas proteínas estruturais (E1, E2 e *core*) e proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), estas participam do ciclo de vida do vírus na célula do hospedeiro (**Figura 1**) (Scheel; Rice, 2013; Murphy et al., 2015).

FONTE: adaptado de Murphy et al., 2015

Figura 1 - Estrutura genômica e proteínas do HCV

O HCV é classificado em 7 genótipos (1 a 7) diferentes com base na análise filogenética e sequência de genomas virais (**Figura 2**). Apesar da divergência da sequência de nucleotídeos entre os genótipos, todos os genótipos do HCV, atualmente, são reconhecidos como hepatotrópicos e patogênicos (Gower et al., 2014; Smith et al., 2014; Messina et al., 2015).

FONTE: Smith et al., 2014

Figura 2 - Árvore filogenética do HCV

1.1.2 Diagnóstico

O principal objetivo do diagnóstico de infecções virais é permitir que as pessoas infectadas sejam identificadas e tratadas. Na prática clínica, os marcadores sorológicos e moleculares utilizados para diagnosticar a hepatite C orientam as decisões e podem monitorar a eficácia do tratamento antiviral.

Assim, o diagnóstico da infecção viral pelo HCV é importante para prevenir a progressão da doença e a propagação do vírus (Chevaliez; Pawlotsky, 2009; Li; Lo, 2015).

O diagnóstico do HCV pode ser realizado por testes indiretos e testes diretos. Os testes indiretos são baseados na detecção do anticorpo específico para o HCV (anti-HCV) e são, geralmente, utilizados na triagem. Os principais testes indiretos empregados são os ensaios imunoenzimáticos (EIA ou ELISA). Atualmente, o teste EIA de terceira geração, para a detecção de anticorpos anti-HCV, é comumente usado nos laboratórios de diagnóstico. A sensibilidade do teste EIA de terceira geração foi estimada em 98,9% e a especificidade encontrada foi de 100% em pacientes com doença hepática crônica. Os ensaios de imunotransferência recombinante (RIBA) podem ser utilizados para confirmar a presença de anticorpos anti-HCV para indivíduos que apresentaram reatividade positiva no teste EIA (Ansaldi et al., 2014; Li; Lo, 2015).

Os testes diretos são utilizados para detectar e quantificar o HCV. Para detectar a presença de RNA do HCV, são utilizados testes de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação da transcrição reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para a quantificação do RNA, é usualmente utilizado a RT-PCR em tempo real. Tanto os testes indiretos como os testes diretos, apresentam um papel importante no diagnóstico e monitoramento da infecção (Li; Lo, 2015, Mukherjee et al., 2015).

1.1.3 Tratamento

O objetivo principal do tratamento para a hepatite C é a erradicação do vírus. Isso resulta em uma diminuição da incidência de novos casos, uma diminuição das complicações da doença hepática crônica, como cirrose e hepatocarcinoma (HCC), e consequentemente em um aumento da qualidade e da expectativa de vida do paciente. O resultado ideal após o tratamento é uma resposta virológica sustentada (RVS), indicada pela não detecção do RNA do vírus a partir da 12^a à 24^a semana após o término do tratamento. Os esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento da hepatite C variam geralmente de

12 a 24 semanas conforme o genótipo do HCV e a existência prévia de cirrose hepática compensada ou descompensada (Brasil, 2018).

Um dos primeiros tratamentos para a hepatite C foi a administração de interferon (IFN) alfa por injeções subcutâneas, considerado um agente imunomodulador. Posteriormente, a ribavirina, um análogo de nucleosídeo com potencial de ação antiviral, foi adicionada ao tratamento para melhorar as taxas de cura. O tratamento da infecção pelo HCV progrediu consideravelmente desde a aprovação de antivirais de ação direta (DAAs) e da disponibilidade de terapias combinadas baseadas em DAAs isentas de interferon alfa peguilado (Peg-IFN α) alfa (Pawlotsky, 2016).

Atualmente, no Brasil, o tratamento da hepatite C está indicado para todos os pacientes com diagnóstico de infecção pelo HCV, tanto na sua forma aguda como na crônica e independentemente do estadiamento da fibrose hepática. No entanto, é importante realizar o estadiamento da fibrose pois pode afetar a condução clínica do paciente e o esquema terapêutico a ser utilizado. Qualquer um dos métodos disponíveis como o APRI ou FIB4, a biópsia hepática e a elastografia hepática podem ser utilizados para avaliar o grau de fibrose hepática (Brasil, 2018).

Para o tratamento da hepatite C, o Sistema Único de Saúde (SUS) dispõe dos seguintes fármacos: daclatasvir, simeprevir e sofosbuvir. Estão, também, disponíveis no SUS as associações dos fármacos ombitasvir, dasabuvir, veruprevir e ritonavir; associações dos fármacos ledipasvir e sofosbuvir; e associações dos fármacos elbasvir e grazoprevir. A adição de ribavirina ao tratamento é indicada para pacientes com cirrose, genótipo 3 do HCV, sexo masculino, idade acima de 40 anos, falhados em esquemas anteriores com IFN ou a critério da equipe médica. As atuais opções terapêuticas apresentam, como vantagens: facilidade posológica, tratamento por um menor período de tempo e com menos efeitos adversos, menor necessidade de exames rotineiros de biologia molecular e altas taxas de respostas quando comparados com as modalidades terapêuticas anteriormente utilizadas (Brasil, 2018).

1.1.4 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 71 milhões de pessoas possuem a infecção crônica pelo HCV no mundo todo. Dentre esses, aproximadamente 399.000 pessoas vão a óbito todo ano em decorrência das complicações da hepatite C crônica, principalmente por cirrose e HCC (WHO, 2018).

A infecção pelo HCV tem distribuição mundial, ocorrendo entre pessoas de todas as idades, gêneros, raças e regiões. Embora o HCV seja endêmico em todo o mundo, existem variações geográficas em sua distribuição. O Oriente Médio foi a região onde se encontrou uma maior prevalência de anti-HCV, 4,7%, sendo o Egito, o país com a maior prevalência do mundo. Na África, foi encontrada uma prevalência de 3,2% de anti-HCV. A Europa e Ásia apresentaram, respectivamente, uma prevalência de 2,3% e 2,1%. As regiões com uma menor prevalência foram as Américas, com 1,5%, e a Oceania com 1,2%. Apesar de muitos países da Ásia terem uma prevalência baixa e intermediária de anti-HCV, aproximadamente 50% das pessoas infectadas no mundo residem nessa região (Lavanchy, 2011; Hajarizadeh et al., 2013).

Pereira et al. (2013), realizaram um estudo transversal nas cinco macrorregiões do Brasil para estimar a soroprevalência dos anticorpos anti-HCV. A prevalência de anticorpos anti-HCV observada foi de 1,38% na população brasileira, estimando que 1,3 milhões de brasileiros apresentam o anticorpo anti-HCV. A soropositividade para o HCV apresentou variação entre as regiões, de 0,68% no Nordeste até 2,10% na região Norte, sendo essa região a que demonstrou maior prevalência em adultos. A prevalência da infecção foi maior nos adultos entre 20 e 69 anos de idade, porém foi igual para ambos os sexos (Pereira et al., 2013). Segundo o Boletim Epidemiológico publicado recentemente pelo Ministério da Saúde, a soroprevalência em 2016 de anti-HCV foi de 0,7%, correspondendo a 670 000 brasileiros com a viremia ativa (Brasil, 2018).

1.1.5 Distribuição geográfica dos genótipos do vírus

A distribuição geográfica global contemporânea dos sete genótipos do HCV é complexa, sendo que estes estão subdivididos em mais de 60 subtipos (1a, 1b, 2a etc.). Os genótipos chegam a apresentar 30% a 50% de diferença no seu RNA. Esta divisão é importante porque cada genótipo e subtipo têm características próprias de agressividade e podem ter resposta diferente aos tratamentos (Smith et al., 2014). Está estabelecido que alguns subtipos, especificamente 1a, 1b, 2a e 3a, estão distribuídos pelo mundo em maior prevalência e são responsáveis por uma grande proporção das infecções por HCV. Segundo Messina et al. (2015), o genótipo 1 é o mais prevalente em todo o mundo, compreendendo 83,4 milhões de casos, representando 46,2% das infecções pelo HCV, mais de um terço desses casos estão localizados no Leste Asiático. O genótipo 3 é o segundo mais prevalente com 54,3 milhões de casos distribuídos globalmente, cerca de 30,1% das infecções. Os genótipos 2, 4 e 6 são responsáveis pela maioria dos demais casos, com estimativas de 16,5 milhões (9,1%), 15,0 milhões (8,3%) e 9,8 milhões (5,4%) de casos, respectivamente. O genótipo 2 prevalece na África Ocidental, o genótipo 3 no Sul da Ásia e partes da Escandinávia, o genótipo 4 nas regiões Central e Norte da África, o genótipo 5 no Sul da África e o genótipo 6 no Sudeste Asiático. Mais recentemente, o genótipo 7 foi identificado no Canadá em um imigrante da África Central (**Figura 2**) (Murphy et al., 2015; Messina et al., 2015).

1.1.6 Transmissão

A transmissão do HCV ocorre, principalmente, através do contato com sangue e/ou material de uso parenteral contaminado. Assim, populações de risco para contrair o HCV são indivíduos que receberam transfusões de sangue, hemoderivados ou imunoglobulinas anti-D durante a gravidez anterior à década de 1990, antes da introdução da triagem do anti-HCV nos doadores de sangue; usuários de drogas intravenosas e usuários de cocaína intranasal; pacientes com tatuagens ou *piercings* corporais; trabalhadores da área da

saúde; pacientes que realizam diálise; e aqueles que praticam atividades sexuais de alto risco (Westbrook; Dusheiko, 2014).

Os países desenvolvidos localizados na América do Norte, no norte da Europa e na sua parte ocidental, bem como a Austrália, são classificados como países com baixa prevalência de HCV. Nesses países o fator de risco mais comum relatado para a aquisição do vírus é o uso de drogas injetáveis. Os países em desenvolvimento apresentam padrões de epidemiologia do HCV altamente heterogêneos, com uma alta prevalência na África e no Oriente Médio e uma prevalência reduzida na Ásia. Na maioria dos países em desenvolvimento, ocorre a transmissão iatrogênica através de transfusão de sangue e procedimentos médicos inseguros. No entanto, os dados dos últimos anos indicam um papel cada vez maior do uso de drogas injetáveis, como via de transmissão do vírus nesses países (Hajarizadeh et al., 2013).

1.1.7 História natural da infecção

Os resultados clínicos após a infecção pelo HCV são muito variáveis de um indivíduo para o outro. Entre os 71 milhões de portadores crônicos da hepatite C no mundo todo, mais de 30 milhões são afetados por cirrose e nesses, cerca de 500.000 novos casos de HCC são identificados todo ano. Para compreender melhor a história natural da infecção devem ser analisados tanto fatores virais como do hospedeiro (Westbrook; Dusheiko, 2014).

A fase aguda da doença refere-se aos primeiros seis meses após a infecção e pode ou não incluir sintomas clínicos. Geralmente, essa fase não é diagnosticada por não apresentar sintomas específicos das hepatites virais. A fase aguda sintomática é observada entre 15% e 30% dos pacientes infectados pelo HCV, ocorre dentro de 5 a 12 semanas após a exposição ao vírus e a duração dos sintomas no geral é de 2 a 12 semanas. Os sintomas, frequentemente são leves, envolvendo sintomas inespecíficos como letargia e mialgia, mas a icterícia, também, pode estar presente. Dos indivíduos infectados pelo HCV, o clareamento do vírus acontece espontaneamente em cerca de 25%, definido como níveis indetectáveis de RNA do HCV no sangue. Os demais, cerca de 75% dos infectados, progridem para a fase crônica da

doença. Uma interação complexa entre o hospedeiro e o vírus determina se ocorre o clareamento espontâneo do vírus ou a persistência da infecção. Alguns fatores, descritos na literatura, têm sido associados ao clareamento espontâneo do vírus como sexo feminino, uma ampla resposta imune, a presença de anticorpos neutralizantes e alterações genéticas no hospedeiro como polimorfismos no gene da interleucina 28 B (IL28B), atualmente chamado de interferon lambda 3 (IFNL3) e interferon lambda 4 (IFNL4), e na região genômica do antígeno leucocitário humano (HLA) classe (Duggal et al., 2013; Hajarizadeh et al., 2013; Lee et al., 2014).

A infecção passa a ser considerada crônica após seis meses de persistência do RNA do HCV no sangue do paciente. As taxas de progressão da fibrose são extremamente variáveis e podem ser influenciadas por fatores do hospedeiro, por fatores virais e fatores ambientais. Após a cronificação da doença, a obtenção de uma RVS induzida por terapia antiviral, está associada com uma redução da hipertensão portal, da frequência de descompensação hepática, da incidência do HCC e da taxa de mortalidade relacionada ao fígado. Caso o tratamento adequado para a hepatite C não for realizado, existe uma chance de desenvolvimento de cirrose em cerca de 10% a 20% dos pacientes com aproximadamente 20 a 30 anos de infecção. No geral, uma vez que a cirrose se desenvolveu, existe um risco anual de 1% a 5% de HCC e um risco anual de 3% a 6% de descompensação hepática. Os últimos estágios da história natural da infecção pelo HCV são a cirrose descompensada, o HCC e, finalmente, a morte do indivíduo. O transplante de fígado é a única opção de tratamento potencialmente favorável para esses pacientes. A infecção pelo HCV ainda é a principal indicação para o transplante de fígado no mundo ocidental (Seeff, 2009; Westbrook; Dusheiko, 2014).

A infecção crônica pelo HCV é conhecida por causar várias manifestações extra-hepáticas. Geralmente, 15% a 35% dos pacientes com HCV crônica têm crioglobulinas circulantes. Entre estes, de 5% a 25% desenvolverão consequências clínicas, incluindo crioglobulinemia mista, vasculite sistêmica, neuropatia periférica, doença de Raynaud e glomerulonefrite membranoproliferativa. O risco de desenvolver um linfoma não-Hodgkin de células B é aumentado para esses pacientes. O HCV, também,

está fortemente associado ao desenvolvimento da resistência à insulina e da diabetes mellitus tipo 2. A erradicação do vírus pode impedir que várias das manifestações extra-hepáticas desta doença se desenvolvam (Westbrook; Dusheiko, 2014; Shiffman; Benhamou, 2015).

1.1.8 Fatores que influenciam a evolução da hepatite C crônica

Dados recentes demonstraram que o desenvolvimento de fibrose hepática na hepatite C é multifatorial. Alguns fatores podem aumentar o risco de um indivíduo desenvolver fibrose ou cirrose. Estes fatores podem ser classificados em fatores do hospedeiro, fatores virais e fatores ambientais (Thein et al., 2008; Westbrook; Dusheiko, 2014).

Em relação aos fatores virais, tem se focado na carga viral e no genótipo viral, mas ainda não há evidências definitivas de que esses fatores afetam a progressão da doença hepática. Em contraste, existem vários fatores do hospedeiro que parecem influenciar a progressão da fibrose. Algumas características demográficas, como idade e gênero podem influenciar a progressão da doença. A infecção em uma idade mais jovem está associada a uma lenta taxa de progressão. Os homens com infecção crônica pelo HCV são mais propensos a evoluir para a cirrose em comparação com as mulheres. Polimorfismos genéticos, também, já foram associados com a progressão da doença hepática. Dentre os fatores metabólicos, a esteatose hepática, resistência à insulina, diabetes e obesidade foram relatados como afetando a progressão da doença. Alcoolismo e tabagismo são fatores comportamentais que, também, estão associados a um risco aumentado de fibrose hepática, bem como coinfeções por outros vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da hepatite B (HBV) (Asselah et al., 2006; Seeff, 2009; Hajarizadeh et al., 2013; Westbrook; Dusheiko, 2014).

Uma comorbidade importante do hospedeiro é a esteatose hepática, presente em cerca de 40% a 80% dos pacientes com hepatite C crônica, sendo mais frequente e grave em pacientes com genótipo 3. A esteatose hepática é uma lesão histológica, presente tanto em indivíduos sem nenhuma condição hepática estabelecida, como em indivíduos com a doença hepática gordurosa

não alcoólica (DHGNA) e com a hepatite C crônica. A esteatose nesses indivíduos tem um impacto significativo na progressão da fibrose hepática (Negro, 2010, Westbrook; Dusheiko, 2014).

1.2 Esteatose hepática na hepatite C crônica

A esteatose hepática é caracterizada por um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos. O aumento de triglicerídeos nessas células pode levar à lipotoxicidade específica das células, contribuindo para várias comorbidades, incluindo a DHGNA e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). A esteatose ocorre em muitas hepatopatias e está associada com alguns fatores, como por exemplo: sobrepeso/obesidade, toxicidade de drogas e consumo excessivo de álcool (Negro, 2010; Stevenson; Utay, 2016).

Aproximadamente, de 40% a 80% dos pacientes com hepatite C crônica que são que realizam a biópsia hepática apresentam esteatose hepática. Certamente, isso depende das características clínicas desses pacientes, relacionadas ao nível do consumo de álcool, sobrepeso/obesidade, diabetes mellitus tipo 2, entre outras. No entanto, quando todos os fatores comuns da esteatose são descartados, a prevalência de esteatose na hepatite C crônica ainda é cerca de 40%, isso sugere que o HCV pode participar diretamente da deposição de triglicerídeos nos hepatócitos (Rubbia-Brandt et al., 2004; Asselah et al., 2006; Negro, 2010; Stevenson; Utay, 2016).

A prevalência da esteatose hepática tem forte dependência genotípica. A infecção pelo genótipo 3 do HCV é amplamente aceita como uma causa independente da esteatose. Uma maior ocorrência e maior gravidade da esteatose foi observada nos pacientes infectados pelo genótipo 3 quando comparado com os infectados pelo genótipo não 3. A esteatose nesses indivíduos correlaciona-se com a carga viral e com a resposta ao tratamento específico para o HCV, dado que o acúmulo de gordura costuma desaparecer em pacientes que atingem uma RVS. Por outro lado, a esteatose em pacientes com genótipos não 3 pode, muitas vezes, permanecer inalterada mesmo em casos de RVS (Negro, 2010; Adinolfi et al., 2013; Negro, 2014; Stevenson; Utay, 2016).

A esteatose hepática em pessoas infectadas pelo HCV também pode ser causada pelos mesmos fatores do hospedeiro que contribuem para a esteatose em pessoas não infectadas com HCV, como a síndrome metabólica, aumento do índice de massa corporal (IMC), hipertrigliceridemia, uso crônico de álcool, outras infecções ou exposição a certos medicamentos. A esteatose causada pela síndrome metabólica ou pela resistência à insulina está associada com a progressão acelerada da fibrose, diminuição da resposta aos regimes de tratamento à base de IFN alfa e aumento do risco para HCC. A esteatose e uso crônico de álcool dentre os pacientes infectados pelo HCV também são fatores que aceleram a progressão da fibrose e aumentam o risco de desenvolver HCC (Adinolfi et al., 2013; Stevenson; Utay, 2016).

Os indivíduos coinfectados com HIV-HCV apresentam uma maior taxa de esteatose quando comparado com os grupos de monoinfectados. Os fatores que, possivelmente, contribuem para isso são: dislipidemia, resistência à insulina devido ao HIV e/ou tratamento com antirretrovirais, obesidade, estilo de vida sedentário e aumento da inflamação sistêmica (Stevenson; Utay, 2016).

Determinantes genéticos como os polimorfismos nos genes *Patatin-like phospholipase domain containing 3* (PNPLA3), *Transmembrane six superfamily member 2* (TM6SF2) e *Microsomal triacylglycerol transfer protein* - proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP) podem predispor pessoas com e sem a infecção por HCV à esteatose hepática (Perlemuter et al., 2002; Valenti et al., 2011; Adinolfi et al., 2013).

1.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica

A DHGNA abrange um amplo espectro de distúrbios hepáticos, caracterizados por um excessivo acúmulo de triglicerídeos no fígado na ausência de ingestão significativa de álcool. Possui um espectro histológico variado, desde a esteatose simples até a EHNA. Uma proporção significativa de pessoas com DHGNA, cerca de 20% a 30%, desenvolvem EHNA, podendo evoluir para fibrose hepática, cirrose e HCC (Adinolfi et al., 2016; Reccia et al., 2017).

Estimativas sugerem que a incidência de DHGNA seja de 20% a 30% nos países ocidentais, e de 5% a 18% nos países orientais. No Brasil, a frequência encontrada de DHGNA foi de 34,4% em um estudo realizado com participantes de diversos centros médicos nas capitais brasileiras. Porém, a prevalência de DHGNA, está aumentando em todo o mundo a cada ano que passa, devido ao estilo de vida sedentário e a dieta utilizada atualmente. Nos Estados Unidos, atualmente, a DHGNA é uma das principais causas de doença hepática crônica. Estima-se que nos próximos 20 anos a DHGNA, seja a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao fígado, bem como uma indicação importante para o transplante hepático (Goulart et al., 2015; Benedict; Zhang, 2017; Dulai et al., 2017).

Existem alguns fatores de risco que estão associados com o desenvolvimento da DHGNA, como: síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2, gênero, idade, dieta, sedentarismo e tabagismo. A DHGNA apresenta uma ampla gama de manifestações histológicas no fígado, que podem variar de uma esteatose simples (acometendo 5% ou mais dos hepatócitos), até formas mais agressivas que demonstram inflamação lobular e/ou portal, balonização dos hepatócitos, fibrose e em última análise cirrose (Benedict; Zhang, 2017).

A DHGNA está estreitamente associada à síndrome metabólica na população em geral, e pode ser considerada como uma doença multissistêmica associada à inflamação, estresse oxidativo e resistência à insulina, com risco crescente de diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e doenças renais crônicas. Além disso, independentemente da síndrome metabólica, recentemente, várias características genéticas do hospedeiro foram relatadas como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de DHGNA. Como polimorfismos nos genes que realizam exportação/oxidação de lipídeos hepáticos, por exemplo: o PNPLA3, TM6SF2, *Nuclear receptor subfamily 1 group 1 member* (NR1I2), *Peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α), *Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase* (PEMT), Apolipoproteína C 3 (ApoC3), Apolipoproteína E (ApoE) e MTP (Adinolfi et al., 2016; Benedict; Zhang, 2017; Miyaaki; Nakao, 2017).

Na infecção crônica pelo HCV, a prevalência média de DHGNA relatada foi cerca de 55%, dependente do genótipo do HCV e da existência da síndrome metabólica. Essa prevalência observada da DHGNA nos pacientes com HCV foi maior do que a encontrada na população geral. As evidências experimentais e clínicas mostraram que as proteínas do *core* do HCV, causam acúmulo de gordura hepática ao ativar *Sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) 1 e 2, inibindo a atividade de MTTP, o que prejudica a montagem, excreção e absorção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). A interação entre o HCV e o metabolismo lipídico do hospedeiro parece ser crucial para o ciclo de vida do vírus. Assim, a esteatose pode ser considerada como um marcador para individualizar pacientes com maior risco de progressão da doença hepática associada ao HCV, desenvolvimento de doenças extra-hepáticas e menor taxa de resposta terapêutica, talvez mesmo na era dos DAAs (Adinolfi et al., 2016).

1.4 MTTP (*microsomal triacylglycerol transfer protein* - proteína de transferência de triglicerídeo microssomal)

A primeira evidência de uma proteína intracelular localizada no lúmen do fígado de mamíferos que realizava transferência de triglicerídeos e ésteres de colesterol foi descrita por Wetterau e Zilversmit em 1984 (Wetterau; Zilversmit, 1984). A proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP) é uma proteína heterodimérica e está localizada em elevada concentração no lúmen do retículo endoplasmático em órgãos como o fígado, o intestino e o coração. Consiste em uma proteína de 97 kDa e possui uma subunidade de dissulfeto isomerase, de 55 kDa, que realiza a transferência de lipídeos (Rubin et al., 2008; Saad et al., 2014).

A função da MTTP está relacionada com a montagem e secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (ApoB), especialmente triglicerídeos e VLDL. Como a MTTP funcional é um requisito absoluto para a montagem de lipoproteínas contendo ApoB, variantes genéticas nesse gene podem ter um impacto nos níveis de lipoproteínas e lipídeos, e assim, no desenvolvimento da esteatose hepática (Zampino et al., 2008; Okumura et al., 2009).

1.4.1 Polimorfismos no gene MTTP

Foram identificados alguns polimorfismos funcionais no gene MTTP localizado no cromossomo 4 humano (localização 4q23) (**Figura 3**). Karpe et al. (1998), detectaram dois polimorfismos funcionais (-400A/T e -493G/T) em uma região promotora do gene MTTP. Os indivíduos homozigotos mutado (TT) para o polimorfismo -493G/T apresentaram níveis significativamente mais baixos de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de triglicerídeos quando comparado aos indivíduos homozigotos selvagem (GG) e heterozigotos (GT). Porém, não houve diferença na concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e VLDL nos indivíduos genotipados para esse polimorfismo. Entre os indivíduos genotipados para o polimorfismo -400A/T, não houve alterações significativas entre os níveis de lipídeos. Esses achados sugerem que alterações genéticas no gene MTTP podem influenciar os níveis de lipídeos plasmáticos em indivíduos saudáveis (Karpe et al., 1998).

FONTE: adaptado de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTTP>

Figura 3 - Localização do gene MTTP

Além desses polimorfismos, outros foram descritos no gene MTTP e também podem estar relacionados com alterações na concentração de lipídeos (Talmud et al., 2000, Ledmyr et al., 2002, Okumura et al., 2009). Ledmyr et al. (2002), avaliaram a influência de sete polimorfismos no gene MTTP (-493G/T, -400A/T, -164T/C, H297Q, Q95H, I128T e Q244E) nos níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas em indivíduos de meia idade. Entre os polimorfismos estudados, três SNPs no gene MTTP (-493G/T, -164T/C e I128T) afetaram significativamente os níveis plasmáticos de LDL e ApoB em homens saudáveis.

Esses mesmos indivíduos homozigotos para o alelo raro, apresentaram maiores IMC, nível de insulina e maiores medidas de circunferência abdominal. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos níveis plasmáticos de HDL, VLDL e triglicerídeos com os genótipos dos polimorfismos estudados. Com base nesses achados, concluíram que variações genéticas no gene MTP podem ter importantes implicações para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Ledmyr et al., 2002).

Talmud et al. (2000), descreveram que homens de meia idade e saudáveis, portadores de três ou quatro alelos raros para os polimorfismos -493G/T e H297Q apresentaram um nível significativamente maior de ApoB em comparação aos demais grupos de genótipos combinados. Indivíduos homozigotos mutado (QQ) para o polimorfismo H297Q com elevados níveis de triglicerídeos ou em combinação com o alelo raro (T) do SNP -493G/T, possuíam nível elevado de ApoB. Portanto, variações no gene MTP podem modular os níveis de produção e secreção de ApoB e assim, contribuir para a variação nos níveis de lipídeos plasmáticos em homens saudáveis (Talmud et al., 2000). A partir desses estudos, surgiram novos trabalhos que investigaram associações de polimorfismos no gene MTP com diversas patologias (Bernard et al., 2000; Lancellotti et al., 2004; Phillips et al., 2004; Namikawa et al., 2004; Gambino et al., 2007).

Um grande estudo de base populacional conduzido na Alemanha forneceu evidências de que o alelo raro do polimorfismo H297Q no gene MTP está associado com menor IMC, circunferência da cintura e colesterol total em mulheres, mas essa associação não foi encontrada em homens. Porém, o polimorfismo I128T no gene MTP não foi associado com nenhuma dessas variáveis presentes na síndrome metabólica (Böhme et al., 2008).

O alelo raro (T) do polimorfismo I128T no gene MTP mostrou estar associado como um fator protetor contra a tolerância à glicose prejudicada, contra diabetes mellitus tipo 2 e outros parâmetros relacionados com a síndrome metabólica (Rubin et al., 2006). Um estudo recente avaliou em portadores do alelo raro do polimorfismo -164T/C no gene MTP se níveis baixos de colesterol estão associados com o aumento da suscetibilidade ao infarto do miocárdio e ao acidente vascular cerebral isquêmico. Uma

associação foi observada entre o polimorfismo -164T/C e os níveis de colesterol total em relação ao desenvolvimento de doença cardiovascular. Assim, os portadores do alelo raro (C) que apresentam níveis baixos de colesterol podem ter uma predisposição a desenvolver doenças cardiovasculares, o que parece não acontecer entre os portadores dos alelos de risco com níveis elevados de colesterol (di Giuseppe et al., 2013). Esses estudos sugerem que existe uma relação entre os polimorfismos funcionais no gene MTTP, com alteração no nível LDL, com características da síndrome metabólica e com o desenvolvimento de doença cardiovascular.

1.4.2 Polimorfismos no gene MTTP e sua relação com a DHGNA

A DHGNA é uma das doenças hepáticas mais comuns no mundo todo. A identificação de variações genéticas que predisõem essa doença poderia ajudar a reconhecer os indivíduos que estão em risco de desenvolver EHNA e auxiliaria na prevenção da doença. Um estudo caso-controle avaliou a associação dos polimorfismos I128T e Q95H no gene MTTP com a DHGNA e comparou com indivíduos saudáveis. Nenhuma associação entre o polimorfismo Q95H e DHGNA foi encontrada, porém os indivíduos heterozigotos (IT) e homozigotos mutados (TT) para o polimorfismo I128T apresentaram um aumento da susceptibilidade de desenvolver DHGNA quando comparado com os indivíduos homozigotos selvagem (II) (Hashemi et al., 2011).

Zheng et al. (2014) e Li et al. (2014), realizaram uma meta-análise com o objetivo de investigar o polimorfismo -493G/T no gene MTTP como um potencial fator de risco para a DHGNA. Os resultados da meta-análise revelaram que em estudos com uma população grande, com mais de 100 indivíduos, o alelo mutado (T) do polimorfismo -493G/T foi fortemente correlacionado com um aumento do risco de desenvolver esteatose hepática, podendo contribuir para o desenvolvimento de DHGNA (Li et al., 2014; Zheng et al., 2014).

O estudo de Peng et al. (2014), investigou se polimorfismos no gene MTTP contribuem para o desenvolvimento de DHGNA em uma população

chinesa. Pacientes com DHGNA apresentaram maior incidência de vários fatores de risco para a síndrome metabólica, incluindo hipertensão arterial elevada, IMC, triglicerídeos, LDL e diminuição de HDL. Em relação à associação dos genótipos dos polimorfismos no gene MTTP com a DHGNA, encontraram após a realização da análise de regressão logística multivariada, uma associação do SNP -164T/C (rs1800804) com um aumento do risco de desenvolver DHGNA, enquanto os SNPs rs1057613 e rs3805335, também no gene MTTP, foram associados com uma diminuição do risco de DHGNA. Outros polimorfismos estudados nesse trabalho, como o -493G/T (rs1800591) e I128T (rs3816873), não foram associados com a DHGNA. Os dados encontrados mostram que os polimorfismos genéticos no gene MTTP podem influenciar a susceptibilidade ao desenvolvimento de DHGNA (Peng et al., 2014; Hsiao et al., 2015; Miyaaki; Nakao, 2017).

1.4.3 Polimorfismos no gene MTTP e sua relação com a hepatite C

Como citado anteriormente, a esteatose hepática é uma característica histológica frequente em pacientes cronicamente infectados com o HCV. A relação entre HCV e esteatose hepática parece ser resultado de fatores epigenéticos e genéticos. Existe uma relação complexa entre o HCV e a MTTP, na fase inicial da doença hepática, pois a MTTP é essencial para a montagem e secreção do vírus, já na fase crônica da doença ocorre uma regulação negativa da MTTP que pode causar comprometimento da secreção de triglicerídeos e acúmulo excessivo de lipídeos no fígado. Além disso, já foi descrito que a presença do alelo mutado (T) do polimorfismo -493G/T no gene MTTP está associada com graus maiores de esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica. (Mirandola et al., 2010).

Zampino et al. (2008) e Mirandola et al. (2009) avaliaram o fragmento hepático, os exames laboratoriais e a existência do polimorfismo -493G/T no gene MTTP em pacientes com hepatite C crônica, considerando o papel patogênico da proteína MTTP no desenvolvimento da esteatose hepática. Os estudos revelaram que os pacientes com hepatite C crônica e portadores do alelo mutado (T) do polimorfismo -493G/T no gene MTTP apresentaram graus

mais elevados de esteatose, indicando uma contribuição relevante do polimorfismo para o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos. O estudo de Zampino et al. (2008), avaliou 102 pacientes virgens de tratamento para a hepatite C e, dentre seus resultados, que os pacientes com genótipo 3 do HCV e portadores do alelo mutado (T) do polimorfismo -493G/T no gene MTTP apresentaram esteatose hepática, níveis elevados de RNA viral e fibrose mais avançada em relação aos portadores do alelo selvagem (G) (Zampino et al., 2008).

Mirandola et al. (2009), avaliaram 298 pacientes com hepatite C crônica e os resultados desse estudo confirmam uma associação significativa entre o polimorfismo no gene MTTP e o acúmulo de gordura no fígado. A idade, o IMC, o HCV genótipo 3 e o alelo mutado (T) do polimorfismo -493G/T foram fatores de risco independentes para desenvolver um grau de esteatose mais avançado na coorte total de pacientes com HCV. Nos pacientes infectados pelo genótipo não 3 do HCV, o alelo T foi o preditor mais forte para a esteatose avançada, portanto, o alelo raro do polimorfismo -493G/T no gene MTTP contribui para o acúmulo de gordura no fígado, em especial nos pacientes HCV genótipo não 3 (Mirandola et al., 2009).

Já Petit et al. (2006), analisaram pacientes com hepatite C crônica e encontraram uma prevalência de esteatose hepática de 45,3% e de fibrose hepática grau 0-1 de 50%, grau 2 de 29% e de grau 3 e 20,9%. Por fim, relataram que o polimorfismo funcional -493G/T no gene MTTP não desempenhou influência no desenvolvimento da esteatose hepática e da fibrose (Petit et al., 2006). No entanto, esse estudo inclui uma coorte de apenas 86 indivíduos com HCV.

Mais recentemente, outro estudo avaliou a influência do polimorfismo -493G/T no gene MTTP no desenvolvimento da esteatose hepática em uma coorte de 239 pacientes com hepatite C crônica de São Paulo. Os resultados mostraram, que a presença do genótipo 3 do HCV e dos genótipos GT/TT do polimorfismo aumenta o risco de esteatose em 25,22 vezes nos pacientes com hepatite C crônica. Isso pode indicar que o polimorfismo -493G/T tem uma contribuição relevante para o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos nos pacientes cronicamente infectados pelo HCV (Magri et al., 2017).

Como justificativa do presente estudo, ressalta-se que ainda não se sabe se existe ou não uma relação entre todos os polimorfismos descritos no gene MTTP e a susceptibilidade para esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica. Portanto, visto que ainda não estão bem estabelecidas essas associações, foram selecionados os polimorfismos -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP para analisar se possuem influência nos níveis de lipídeos plasmáticos e na esteatose hepática associada ao HCV. Por fim, identificar se estes seriam possíveis marcadores importantes para a detecção precoce da esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

2. OBJETIVOS

Detectar a presença dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -164T/C, -400A/T e H297Q no gene proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP) em pacientes com hepatite C crônica.

Avaliar a influência dos SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP nos níveis de lipídeos plasmáticos e na esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

3. MÉTODOS

Trata-se de estudo retrospectivo e complementar a pesquisa intitulada “Manifestações extra-hepáticas da Hepatite C – estudo transversal” (Protocolo de Pesquisa CAPPesq nº 0914/09). O presente estudo utilizou o material coletado originalmente para a pesquisa citada acima, que foi realizada entre 2010 e 2012.

Descreveremos o estudo fonte do material para a pesquisa atual e em seguida descreveremos com mais detalhes a presente investigação.

Estudo “Manifestações extra-hepáticas da Hepatite C – estudo transversal”

O objetivo principal desse estudo foi avaliar a frequência das manifestações extra-hepáticas, clínicas e laboratoriais, em pacientes com hepatite C crônica. Dentre as manifestações extra-hepáticas avaliou-se a frequência das principais manifestações associadas à hepatite C que são: crioglobulinemia mista, linfoma não-Hodgkin de células B, gamopatias monoclonais, porfiria cutânea tarda, líquen plano, diabetes mellitus, tireoidite autoimune, câncer de tireoide, síndrome de Sjögren (síndrome sicca), alveolite, fibrose pulmonar, nefropatias não-crioglobulinêmicas, disfunções eréteis, aterosclerose de carótida e distúrbios psicopatológicos em pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica 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 (HCFMUSP), o qual é considerado um serviço de referência para atendimento de hepatites virais pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. O estudo original constou de uma entrevista, uma consulta médica e coleta de 10 ml de sangue que foi armazenado no Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus (LIM-47) em freezer -80°C.

Os critérios de inclusão utilizados para o estudo original foram:

- Paciente atendido no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP, no período de 01.01.2006 a 31.12.2008.

- Idade ≥ 18 anos.
- Infecção crônica pelo HCV, definida pela presença anti-HCV reagente pesquisado pelo método imunoenzimático (ELISA) e pela presença de RNA-HCV detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por mais de seis meses.
- Paciente sem tratamento prévio específico para a hepatite C.
- Estudo anatomopatológico de fragmento hepático, realizado nos últimos 3 anos.

Os critérios de exclusão utilizados foram:

- Infecção pelo HBV e HIV.
- Condições hepáticas de outras etiologias, incluindo Doença de Wilson, cirrose biliar primária, alcoólica e doença hepática autoimune.

Em entrevista e consulta médica foram investigados os dados demográficos (sexo e idade), dados antropomórficos (peso e altura), fatores de risco para aquisição do HCV, hábitos (etilismo e tabagismo), nível sérico de RNA do HCV, genótipo do HCV e testes laboratoriais.

3.1 Casuística

Dos 349 pacientes recrutados para o estudo “Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal” foram selecionados 236 pacientes com hepatite C crônica atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP, cujos dados estavam completos para o respectivo estudo, representando um número maior de pacientes em relação ao tamanho de amostra mínima calculada (descrita na seção **3.4**).

3.1.1 Aspectos éticos

O soro dos pacientes foi coletado para a realização de exames laboratoriais do projeto de pesquisa “Manifestações extra-hepáticas da hepatite

C – estudo transversal” e guardado em freezer a -80°C no LIM-47 do HCFMUSP. Os pacientes foram contatados, foi fornecida explicação sobre os objetivos da presente pesquisa e aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo A**). Foi também informado que o paciente poderia participar, recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento, sem qualquer prejuízo. Foi mantido sigilo sobre a identidade de todos os indivíduos do estudo, que foram identificados por números.

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP, número do parecer 1.645.384/2016 (**Anexo B**).

3.2 Avaliação clínica, laboratorial e histológica

Para a investigação atual, realizamos a revisão dos dados de interesse obtidos no estudo “Manifestações extra-hepáticas” e a revisão dos prontuários dos pacientes selecionados, no qual obtivemos dados de exames de laboratório e do estudo anatomopatológico do fragmento hepático obtido antes de receberem tratamento específico para hepatite C (IFN/Peg-IFN α associado ou não à ribavirina). A coleta de sangue para os exames laboratoriais foi realizada no dia que o paciente entrou no estudo “Manifestações extra-hepáticas” e os dados do estudo anatomopatológico utilizados foram referentes à biópsia hepática realizada mais próxima da data da coleta do sangue. Na **Tabela 1** estão descritos os exames laboratoriais avaliados e o valor de referência de cada exame quando considerado alterado.

Tabela 1 - Valores de referência considerado alterado dos exames laboratoriais realizados nos pacientes com hepatite C crônica incluídos no estudo

Exames laboratoriais	Valor de referência^a
ALT	≥41 U/L
AST	≥37 U/L
GGT	≥61 U/L
Glicose	>99 mg/dL
Insulina	≥25 µU/mL
Triglicerídeos	≥150 mg/dL
Colesterol total	≥200 mg/dL
LDL	≥130 mg/dL
VLDL	≥40 mg/dL
HDL	<65 mg/dL
Ferro	>158 µg/dL
Ferritina	>400 ng/mL
Carga viral HCV	
Baixa	<850.000 UI/ml
Alta	≥850.000 UI/ml

^a Valor de referência quando considerado alterado

ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteínas de densidade muito baixa; HDL: Lipoproteína de alta densidade; HCV: Vírus da hepatite C

Baseado nos dados da insulina e da glicemia de jejum foi calculado o índice HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) dos participantes e foi considerado resistente à insulina o paciente que apresentou HOMA-IR ≥3,0 (Moucari et al., 2008; Oliveira et al., 2012). Esse índice foi calculado usando a seguinte fórmula: $\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulinemia de jejum (}\mu\text{U/mL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)} \times 0,0555}{22,5}$. Para calcular o IMC, o peso foi dividido pela altura ao quadrado (kg/m^2).

A biópsia hepática é o exame mais preciso e padrão-ouro para a avaliação da fibrose hepática e pode ser realizada por diferentes técnicas e tipos de agulha. Além disso, é útil para diagnosticar doenças hepáticas

concomitantes como EHNA. Pelo sistema METAVIR foram avaliados o grau de fibrose e de atividade inflamatória do fígado. Para fibrose: F0-Ausência de Fibrose, F1-Fibrose Portal sem Septos, F2-Fibrose Portal com Raros Septos, F3-Numerosos Septos sem Cirrose e F4-Cirrose. Para atividade inflamatória: A0-Ausência de atividade inflamatória, A1-Atividade Leve, A2-Atividade Moderada e A3-Atividade Intensa (The French METAVIR Cooperative Study Group, 1994). O grau de esteatose foi avaliado, conforme descrito por Kleiner et al. (2005): grau 0-Ausência de esteatose (<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) (Kleiner et al., 2005). A siderose hepática foi avaliada pela coloração de Perls com pontuação de 0-3.

Utilizamos as amostras de soro coletadas na pesquisa original para realização dos estudos de Biologia Molecular, descritos a seguir.

3.3 Métodos laboratoriais

A avaliação de níveis séricos de RNA do HCV e genotipagem do HCV foi realizada no LIM-47 do HCFMUSP. Para avaliação da presença dos polimorfismos -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP foram utilizadas as amostras de soro que estão armazenadas no LIM-47 em freezers -80°C.

A parte experimental foi conduzida no LIM-47, o qual está equipado para a realização de técnicas de Biologia Molecular, com salas separadas de pré e pós-amplificação de DNA, além de equipamentos que proporcionam autonomia na realização das técnicas de PCR e de análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Todas as normas de biossegurança e de qualidade em técnicas de Biologia Molecular foram respeitadas.

3.3.1 Extração e purificação de DNA

A extração do DNA (ácido desoxirribonucleico), a partir de 200 µL soro, foi realizada utilizando kit o *ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System* (Promega,

Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A purificação do DNA utilizando esse kit é feita através de membranas de sílica.

O protocolo foi realizado da seguinte maneira: em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, foram adicionados 20 µL de Proteinase K, 200 µL do soro e 200 µL do tampão de lise (*Cell Lysis Buffer*), agitando-se no vórtex por 10 segundos (seg) e incubando em bloco de aquecimento a 56°C por 10 minutos (min). Após a incubação, foi adicionado 250 µL do tampão de lise (*Binding Buffer*) e agitado no vórtex por 10 seg. Posteriormente, todo o conteúdo foi transferido para uma coluna com filtro (membrana de sílica), seguido de centrifugação a 13.000 rotações por minuto (rpm) durante 1 min, e em seguida a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 mL. Foram realizadas três lavagens e em cada lavagem foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem (*Wash Solution*) à coluna, centrifugado a 13.000 rpm por 3 min e novamente a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 mL. No final da terceira lavagem, a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL, onde foi acrescentado 60 µL água livre de nuclease (*Nuclease-Free Water*), fornecida pelo kit, centrifugado a 14.000 rpm por 1 min. Foram acrescentados apenas 60 µL água livre de nucleasse a fim de deixar mais concentrada a quantidade de DNA nessas amostras. Por fim, foram obtidos 60 µL de volume final de DNA extraído que foi estocado a -80°C até o momento do uso.

3.3.2 Genotipagem dos polimorfismos no gene MTTP

Após extração do DNA, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase seguida de análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), que é evidenciada pela fragmentação do DNA em sítios específicos através do uso de enzimas de restrição. O protocolo utilizado para cada PCR foi selecionado da literatura e foi realizado com base nas descrições de Karpe et al. (1998) e Ledmyr et al. (2002). A quantidade dos reagentes e as condições de ciclagem foram ajustadas para otimizar as reações de PCR, as quais foram definidas pela observação da banda mais nítida e forte no gel de agarose. Todos os polimorfismos estudados estão localizados no gene MTTP no cromossomo 4 humano (localização 4q23).

Os *primers* (ou iniciadores) utilizados na PCR foram selecionados da literatura e foram verificados. Cada um dos *primers* foi alinhado com sequência de referência e cada nucleotídeo foi conferido. Para isso, foi utilizada a sequência do gene MTTP disponível no banco de dados do GenBank no website do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), número de acesso no GenBank-NCBI: NG_011469.1, utilizando a ferramenta *ClustalW Multiple-Sequence Alignment* do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.3. As temperaturas ideais dos *primers* foram calculadas usando a ferramenta *Oligo Calculator* disponível no site da Universidade de Pittsburgh (<http://www.bioinformatics.org/jambw/3/1/9/index.html>).

As sequências dos *primers* utilizados e o tamanho do fragmento amplificado nas reações de PCR estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Primers utilizados nas reações de amplificação (PCR) do gene MTTP e tamanho do fragmento amplificado

SNPs MTTP	Primers - Sequência 5' → 3'	Fragmento (pb)
-164T/C	Forward GGTTTGGTTTAGCTCTCAAAAGTG	220
rs1800804	Reverse AGTGAGGGAGTGACCCTCTTC	
-400A/T	Forward CCCTCTTAATCTCTTTCCTAGAA	838
rs1800803	Reverse AAGAATCATATTGACCAGCAATC	
H297Q	Forward GAATGATTATAATATAGCATTTC	231
rs2306985	Reverse GTCTGATGTCATGATTATTCC	

pb: Pares de base

A etapa seguinte foi realizar a padronização dos protocolos das reações de PCR. A temperatura da ciclagem foi ajustada, para obtenção de maior nitidez das bandas em gel de agarose e os protocolos sofreram trocas de reagentes, eles foram otimizados com o uso da *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) para proporcionar uma maior estabilidade a reação.

Em relação à quantidade dos reagentes, inicialmente as PCRs foram padronizadas para um volume final de 50 µl, onde a reação foi composta de: 25

μL de *GoTaq Green Master Mix 2X* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2 μL de cada *primer* na concentração de 10 pmol/ μL (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 16 μL de água ultra pura (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 5 μL de DNA extraído. Em seguida, o protocolo da PCR foi otimizado para um volume final de 16,7 μL (**Tabela 3**) obtendo a mesma qualidade de resultados da primeira padronização e diminuindo a quantidade de reagentes utilizados, assim os custos foram menores e ficou na quantidade ideal para a realização da RFLP. Foi realizada uma reação em todos os ensaios contendo os componentes acima, porém incluindo água ultra pura ao invés do DNA extraído, utilizada como controle negativo. Além disso, algumas amostras tiveram todos os ensaios repetidos, a fim de confirmar os resultados obtidos, garantir sua qualidade e repetitividade.

Tabela 3 - Protocolo dos ensaios de PCR com volume final de 16,7 μL para detecção dos polimorfismos no gene MTTP

Condições da reação	PCR
<u>Reagentes</u>	
<i>GoTaq Green Master Mix 2X</i>	8,3 μL
<i>Primer forward</i> 10 pmol/ μL	0,7 μL
<i>Primer reverse</i> 10 pmol/ μL	0,7 μL
Água ultra pura	5,3 μL
DNA <i>input</i>	1,7 μL
Volume final	16,7 μL

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando o termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), com uma desnaturação inicial a 94°C por 3-5 min e extensão final a 72°C por 5 min. A temperatura de pareamento dos *primers* variou de acordo com o tamanho e a composição dos mesmos.

Após os ciclos de amplificação, a visualização do fragmento amplificado foi feita em gel de agarose na concentração de 3%, sendo 3 gramas de agarose em 100 mL de tampão TBE 1x concentrado (Tris-Borato EDTA - Promega, Madison, Wisconsin, EUA), corado com 6 μL do *UniSafe Dye*

(20.000x - Uniscience, Miami, Flórida, EUA), após a corrida em uma cuba de eletroforese Horizon 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) contendo tampão TBE 0,5x concentrado. Foram aplicados no gel 5 µL do produto amplificado pela PCR e 4 µL do padrão de peso molecular de DNA de 50 pb ou 100 pb (*DNA Ladder* - Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). O padrão de tamanho molecular foi diluído da seguinte maneira: 5 µL do padrão, 20 µL do *BlueJuice Gel Loading Buffer* (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), e 90 µL de água ultra pura. A separação eletroforética foi realizada com uma corrente constante de 100V, a 400 amperes, por 50 minutos. Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas em um fotodocumentador UVIdoc HD2 (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido) sob transiluminador de luz ultravioleta (UV).

As digestões enzimáticas dos produtos da PCR foram realizadas utilizando a técnica de RFLP, para discriminar o genótipo de cada um dos polimorfismos pesquisados no gene MTTP (**Tabela 4**). Os produtos das digestões com as enzimas de restrição foram observados como bandas em gel de agarose após eletroforese. Foram utilizados padrões de peso molecular de 50 pb ou 100 pb como referência.

Tabela 4 - Enzimas de restrição utilizadas na técnica de RFLP para a genotipagem dos polimorfismos no gene MTTP

SNP	Enzima de restrição	Sequência	Sítio de clivagem
-164T/C / H297Q	<i>BsrI</i>	ACTGG	A C T G G N / T G A C / C N
-400A/T	<i>SspI</i>	AATATT	A A T / A T T T T A / T A A

N=A ou T ou G ou C

Anterior a padronização da RFLP, foram construídos mapas de predição de endonuclease para verificar o local exato de corte de cada enzima de restrição usando a ferramenta NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>), e cada mapa foi comparado com os padrões do gel da RFLP.

Para a construção dos mapas, buscamos no website do banco de dados do GenBank a sequência do gene MTTP, curada pela equipe do NCBI, com 66915 pb (número de acesso no GenBank: NG_011469). Utilizando a ferramenta de bioinformática *ClustalW Multiple-Sequence Alignment* do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, alinhamos a sequência do GenBank com as sequências dos *primers forward* e *reverse* utilizados na técnica de PCR. Após uma edição na sequência original do fragmento amplificado, foi substituído o alelo selvagem pelo alelo mutado, devido ao fato dessas enzimas atuarem quando existe a mutação, com a intenção de verificar o local exato de corte da enzima. Logo, foi construído o mapa de restrição enzimático e, assim, foi possível confirmar os tamanhos dos fragmentos a serem gerados pela RFLP.

3.3.2.1 Polimorfismo -164T/C (rs1800804) no gene MTTP

A **Tabela 5** mostra o protocolo adaptado da reação de PCR para a amplificação de um fragmento de 220 pb incluindo o polimorfismo -164T/C, baseado na descrição de Ledmyr et al. (2002). Para identificar o genótipo do polimorfismo -164T/C no gene MTTP, o amplificado foi digerido pela enzima de restrição de endonuclease *BsrI* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA), que reage a 65°C (**Tabela 6**).

Tabela 5 - Protocolo do ensaio de PCR para amplificação do fragmento de 220 pb para a genotipagem do SNP -164T/C no gene MTTP de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP

Condições da reação		PCR -164T/C ^a
<u>Reagentes</u>		
	<i>Go Taq Green 2X</i>	8,3 µL
	<i>Primer MTTP164 Forward</i>	0,7 µL
	<i>Primer MTTP164 Reverse</i>	0,7 µL
	Água ultra pura	5,3 µL
	DNA <i>input</i>	1,7 µL
	Volume final	16,7 µL
		94°C – 3 min
Condições de ciclagem	35 ciclos	<div style="border-left: 2px solid black; padding-left: 10px; margin-left: 10px;"> 94°C – 45 seg 56°C – 30 seg 72°C – 1 min 72°C – 5 min 8°C – ∞ </div>

^a Adaptado de Ledmyr et al. (2002)

Tabela 6 - Protocolo do ensaio de RFLP para a genotipagem dos polimorfismos -164T/C e H297Q de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP

Reagentes	RFLP -164T/C ^a e H297Q ^a
Enzima <i>BsrI</i> (5U/μL)	0,5 μL
Tampão	2,0 μL
Água ultra pura	2,5 μL
Produto amplificado da PCR	15,0 μL
Volume final	20,0 μL
	65°C – 15 min
Condições de Incubação e Inativação	80°C – 20 min
	4°C – ∞

^a Adaptado de Ledmyr et al. (2002)

Conforme descrito anteriormente, antes da realização da reação de PCR-RFLP foi construído um mapa de predição de endonuclease para verificar o local exato do corte da enzima *BsrI* no fragmento amplificado pela PCR para a genotipagem do SNP -164T/C. A partir da sequência amplificada na PCR, a enzima de restrição realiza o corte na posição 50 do fragmento quando existe a substituição do nucleotídeo T pelo C na posição 46, conforme pode ser observado na **Figura 4**.

Resumindo, na presença do alelo mutado (C) a enzima de restrição atua clivando o fragmento de 220 pb em dois fragmentos de tamanhos diferentes, um de 170 pb e outro de 50 pb. Quando se tem a presença do alelo selvagem (T), o sítio de clivagem da enzima é eliminado e o fragmento de 220 pb, amplificado na técnica de PCR, continua com o mesmo tamanho.

Figura 4 - Mapa de restrição enzimática de sequência do gene MTTP (número de acesso no GenBank: NG_011469) **A)** Mapa da sequência completa de 220 pb. **B)** Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 18 ao 77, destacando a posição de corte (nucleotídeo 50) da enzima de restrição *BsrI*

3.3.2.2 Polimorfismo -400A/T (rs1800803) no gene MTTP

A **Tabela 7** mostra o protocolo adaptado da reação de PCR para a amplificação de um fragmento de 838 pb no gene MTTP, baseado na descrição de Karpe et al. (1998). Foi realizada a técnica de RFLP para a digestão enzimática do produto da PCR, e assim discriminar o genótipo do polimorfismo -400A/T no gene MTTP. O amplificado foi digerido pela enzima de restrição de

endonuclease *SspI* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA), que reage a 37°C (Tabela 8).

Tabela 7 - Protocolo do ensaio de PCR para amplificação do fragmento de 838 pb para a genotipagem do SNP -400A/T no gene MTTP de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP

Condições da reação		PCR -400A/T ^a
<u>Reagentes</u>		
<i>Go Taq Green 2X</i>		8,3 µL
<i>Primer MTTP400 Forward</i>		0,7 µL
<i>Primer MTTP400 Reverse</i>		0,7 µL
Água ultra pura		5,3 µL
DNA <i>input</i>		1,7 µL
Volume final		16,7 µL
Condições de ciclagem 35 ciclos		94°C – 5 min
		94°C – 30 seg
		55°C – 1 min
		72°C – 3 min
		72°C – 5 min
		8°C – ∞

^a Adaptado de Karpe et al. (1998)

Tabela 8 - Protocolo do ensaio de RFLP para a genotipagem do polimorfismo -400A/T de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP

Reagentes	RFLP -400A/T ^a
Enzima <i>SspI</i> (5U/μL)	1,0 μL
Tampão	2,0 μL
Água ultra pura	2,0 μL
Produto amplificado da PCR	15,0 μL
Volume final	20,0 μL
	37°C – 15 min
Condições de Incubação e Inativação	35°C – 20 min
	4°C – ∞

^a Adaptado de Karpe et al. (1998)

Após o alinhamento da sequência do gene MTTP com os *primers forward* e *reverse* utilizados na técnica de PCR para a genotipagem do SNP -400A/T, foi encontrado um nucleotídeo a mais no *primer forward* utilizado por Karpe et al. (1998), dessa forma o fragmento amplificado que seria composto por 837 pb passou a ser composto por 838 pb. Nesse caso, a partir da sequência amplificada na PCR pode ser observado que a enzima liga na presença do alelo mutado T, na posição 343 do fragmento amplificado e realiza o corte nessa posição, conforme pode ser observado na **Figura 5**.

Em outras palavras, na presença do alelo mutado (T) a enzima de restrição atua clivando o fragmento de 838 pb em dois fragmentos de tamanhos diferentes, um de 494 pb e outro de 344 pb. Quando se tem pelo menos um alelo selvagem, a presença da adenina (A) elimina o sítio de clivagem da enzima e o fragmento de 838 pb, amplificado na técnica de PCR, continua com o mesmo tamanho.

Figura 5 - Mapa de restrição enzimática de sequência do gene MTTP (número de acesso no GenBank: NG_011469) **A)** Mapa da sequência amplificada de 837 pb. **B)** Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 312 ao 371, destacando a posição de corte (nucleotídeo 343) da enzima de restrição *SspI*

3.3.2.3 Polimorfismo H297Q (rs2306985) no gene MTTP

A **Tabela 9** mostra o protocolo adaptado da reação de PCR para a amplificação de um fragmento de 231 pb incluindo o polimorfismo H297Q, baseado na descrição de Ledmyr et al. (2002). A técnica de RFLP foi utilizada para discriminar o genótipo do polimorfismo H297Q no gene MTTP nos pacientes com hepatite C crônica, o amplificado foi digerido pela enzima de restrição de endonuclease *BsrI* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA), que reage a 65°C (**Tabela 6**). Nesse polimorfismo quando existe a substituição da citosina (C) pela guanina (G) a sequência do aminoácido produzido sofre uma alteração, gerando a substituição de histidina (H) e para glutamina (Q).

Tabela 9 - Protocolo do ensaio de PCR para amplificação do fragmento de 231 pb para a genotipagem do SNP H297Q no gene MTTP de pacientes com hepatite C crônica do HCFMUSP

Condições da reação		PCR H297Q ^a
<u>Reagentes</u>		
<i>Go Taq Green 2X</i>		8,3 µL
<i>Primer MTTP297 Forward</i>		0,7 µL
<i>Primer MTTP297 Reverse</i>		0,7 µL
Água ultra pura		5,3 µL
DNA <i>input</i>		1,7 µL
Volume final		16,7 µL
Condições de ciclagem 35 ciclos		94°C – 3 min
		94°C – 45 seg
		52°C – 30 seg
		72°C – 1 min
		72°C – 5 min
		8°C – ∞

^a Adaptado de Ledmyr et al. (2002)

Para esse SNP, também foi construído um mapa de predição de endonucleases antes da realização da técnica de RFLP a fim de verificar o local exato de corte da enzima de restrição *BsrI*. Pode ser observado na **Figura 6** que a enzima *BsrI* se liga na presença do alelo mutado G (posição 173 do fragmento amplificado), e faz o corte na posição 170. Assim, foi possível confirmar o local de corte da enzima e os tamanhos dos fragmentos a serem gerados pela RFLP.

Na presença do alelo mutado (G) a enzima de restrição atua clivando o fragmento de 231 pb em dois fragmentos de tamanhos diferentes, um de 170 pb e outro de 61 pb. Na presença do alelo selvagem (C), o sítio de clivagem da enzima é eliminado e o fragmento de 231 pb, amplificado na técnica de PCR continua com o mesmo tamanho.

Figura 6 - Mapa de restrição enzimática de sequência do gene MTTP (número de acesso no GenBank: NG_011469). **A)** Mapa da sequência completa de 231 pb. **B)** Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 138 ao 197, destacando a posição de corte (nucleotídeo 170) da enzima de restrição *BsrI*

3.4 Análise dos dados coletados

Para o cálculo do tamanho de amostra mínima necessária, foram considerados os seguintes parâmetros: erro alfa de 5%; erro beta de 20% e, consequentemente um poder de 80%. Erro padrão de 2. Foi utilizada a equação, $n = \pi (1 - \pi) / e^2$, recomendada para esse tipo de estudo, onde n = tamanho da amostra (mínimo requerido), π = proporção de interesse, e = erro padrão (Kirkwood; Sterne, 2006). Em relação à frequência de pacientes com hepatite C crônica, homozigotos mutado (TT) para o SNP -493G/T no gene MTTP, tomou-se como referencial dados de Mirandola et al. (2009) e Zampino et al. (2008). Tamanho de amostra mínima calculada: 225 pacientes.

No respectivo estudo, foram calculadas as frequências gênicas e as frequências genotípicas. A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson, o valor de p foi significativo quando $\geq 0,05$, comparando as frequências genotípicas obtidas com as frequências genotípicas esperadas pelo princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O cálculo do equilíbrio para todos os polimorfismos genotipados (-164T/C, -400A/T e H297Q) foram feitos com o auxílio do programa Microsoft Excel versão 14.0.7188.5002 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA).

Foram descritas as características dos pacientes, com uso de frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas e medidas resumo (média e desvio padrão - DP) para as variáveis quantitativas (Kirkwood; Sterne, 2006).

Foram descritas as características avaliadas segundo o genótipo de cada SNP com diferentes modelos genéticos (modelo co-dominante, modelo dominante e modelo recessivo) e verificada a associação das características dos pacientes com os modelos genéticos utilizados por meio de testes qui-quadrado, testes da razão de verossimilhanças ou testes exatos de Fisher (Kirkwood; Sterne, 2006). Os graus de esteatose foram descritos segundo os três modelos genéticos utilizados e foi verificada a existência de associação com uso de testes qui-quadrado ou testes da razão de verossimilhanças. A frequência de esteatose foi descrita segundo as características, verificada a associação com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher, estimados os *Odds Ratio* de cada variável com a presença de esteatose com os respectivos intervalos de 95% de confiança com uso de análise bivariada (Hosmer; Lemeshow, 2000). Todas as interações de primeira ordem dos genótipos dos SNPs com cada característica foram testadas isoladamente e depois inseridas no modelo múltiplo de regressão logística para avaliar em conjunto quais características influenciam a presença de esteatose. Foram incluídos no modelo múltiplo de regressão logística todas as variáveis e as interações que nos testes bivariados apresentaram nível de significância de 0,20 ($p < 0,2$).

Para tabulação dos dados foi utilizado o programa Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA) e para a realização das análises foi utilizado o programa IBM-SPSS *for Windows* versão 20.0 (International Business Machines, Nova Iorque, Nova Iorque, EUA). Os testes foram realizados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Foram incluídos 236 pacientes com hepatite C crônica atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP.

4.1 Características gerais

Dos participantes do estudo, 56,4% eram do sexo feminino, a média de idade foi de 55,5 anos com uma variação de 29 a 83 anos. Em relação à distribuição dos pacientes segundo as comorbidades, a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e disfunção na tireoide não foram observadas na maioria dos participantes do estudo. Porém, dentre essas, a hipertensão arterial foi a com maior prevalência (36,4%). Foram encontrados três grupos raciais autodeclarados, sendo que 81,3% dos pacientes se autodeclararam como brancos. As principais características demográficas e clínicas estão descritas na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Distribuição dos 236 pacientes incluídos no estudo segundo sexo, faixa etária, IMC e comorbidades

Características	n (%) / média ± DP
Sexo (Feminino)	133 (56,4)
Idade (anos)	55,5 ± 12
IMC	26,6 ± 4,3
Hipertensão Arterial	86 (36,4)
Diabetes Mellitus	36 (15,3)
Disfunção na Tireoide	29 (12,3)
Raça	
Branco	191 (81,3)
Negro	14 (6,0)
Pardo	30 (12,7)

DP: Desvio padrão; IMC: Índice de massa corporal

A principal forma de aquisição do HCV segundo antecedentes epidemiológicos relatados durante a entrevista foi por transfusão sanguínea, o

que corresponde a 98 (41,5%) indivíduos. A **Tabela 11** mostra a distribuição dos pacientes em relação aos fatores de risco conhecidos para aquisição do HCV e em relação aos hábitos dos pacientes, como etilismo e tabagismo.

Tabela 11 - Distribuição dos 236 pacientes segundo antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do vírus da hepatite C, etilismo e tabagismo

Variável	n (%)
Transfusão sangue	98 (41,5)
Droga inalatória	29 (12,3)
Droga injetável ^a	14 (6,0)
Acupuntura	47 (19,9)
Tatuagem	27 (11,4)
Parceiro HCV ^a	19 (8,9)
Fumo ^a	128 (54,5)
Grau de etilismo	
Não bebe	148 (62,7)
Até 20 g/dia	42 (17,8)
20 a 50 g/dia	25 (10,6)
>50 g/dia	21 (8,9)

^a Nem todos possuem a informação

HCV: Vírus da hepatite C

A **Tabela 12** mostra a média dos níveis séricos e suas variações nos exames laboratoriais selecionados. Médias acima dos valores de referência foram encontradas em relação às enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) e o HOMA-IR. A distribuição dos pacientes segundo as características do HCV é apresentada na **Tabela 13**. A maioria das infecções foi pelo genótipo 1 e não foi encontrada nenhuma infecção pelos genótipos 4, 6 e 7 do vírus.

Tabela 12 - Distribuição dos 236 participantes do estudo segundo exames laboratoriais

Exames Laboratoriais	Média ± DP
Glicose	89,7 ± 39,2
Insulina^a	14,1 ± 11,6
ALT	60,9 ± 45,2
AST	49,5 ± 38,3
GGT	87,3 ± 99,9
Ferro^a	125,6 ± 53,1
Ferritina^a	335,4 ± 384,3
Colesterol Total	172,9 ± 38,9
HDL	54,6 ± 17
LDL	96,9 ± 34,6
VLDL	21,4 ± 11,9
Triglicerídeos	107 ± 61,4
HOMA-IR^a	3,3 ± 3,5

^a Nem todos possuem a informação

DP: Desvio padrão; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*

Tabela 13 - Distribuição dos 236 pacientes segundo características do vírus da hepatite C

Características do HCV	n (%)
Genótipo	
1	182 (77,1)
2	7 (3,0)
3	43 (18,2)
5	4 (1,7)
Carga Viral^a	
<850.000	94 (41,4)
≥850.000	133 (58,6)

^a Nem todos possuem a informação

HCV: Vírus da hepatite C

Na **Tabela 14** está retratada a distribuição dos pacientes com hepatite C crônica incluídos na pesquisa de acordo com as características do estudo

anatomopatológico do fragmento hepático. A esteatose hepática esteve presente em 53% dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 14 - Distribuição dos 236 pacientes segundo características anatomopatológicas encontradas em fragmento hepático

Variável	n (%)
Grau Fibrose	
0	39 (16,5)
1	93 (39,4)
2	55 (23,3)
3	27 (11,5)
4	22 (9,3)
Grau Atividade Inflamatória	
0	2 (0,8)
1	78 (33,1)
2	121 (51,3)
3	35 (14,8)
Grau Esteatose	
0	111 (47,0)
1	92 (39,0)
2	26 (11,0)
3	7 (3,0)
Grau Siderose	
0	221 (93,6)
1	12 (5,1)
2	3 (1,3)

4.2 Fatores associados à esteatose hepática

A **Tabela 15** mostra os fatores que estiveram associados com a esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica na análise bivariada. Os fatores que tiveram um $p < 0,20$ na análise bivariada foram incluídos na análise multivariada e esses dados estão descritos na **Tabela 16**. Dentre as variáveis, o sexo feminino ($p = 0,011$), a infecção pelo genótipo 3 do HCV ($p = 0,013$) e a atividade inflamatória de moderada a alta intensidade ($p < 0,001$) estiveram associadas com a presença de esteatose hepática nos indivíduos incluídos no estudo na análise multivariada.

Tabela 15 - Fatores associados à presença de esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica

Variável	Esteatose Ausente n (%)	Presente n (%)	OR	IC (95%)		p
				Inferior	Superior	
Idade (anos)						0,021
<50	40 (58,8)	28 (41,2)	1,00			
≥50	71 (42,3)	97 (57,7)	1,95	1,10	3,46	
Sexo						0,047
Masculino	56 (54,4)	47 (45,6)	1,00			
Feminino	55 (41,4)	78 (58,6)	1,69	1,01	2,84	
Genótipo 3 HCV						0,005
Não	99 (51,3)	94 (48,7)	1,00			
Sim	12 (27,9)	31 (72,1)	2,72	1,32	5,61	
ALT						0,066
<41	54 (54,0)	46 (46,0)	1,00			
≥41	57 (41,9)	79 (58,1)	1,63	0,97	2,74	
AST						0,001
<37	67 (58,3)	48 (41,7)	1,00			
≥37	44 (36,4)	77 (63,6)	2,44	1,45	4,13	
GGT						0,038
8-61	70 (53,0)	62 (47,0)	1,00			
>61	41 (39,4)	63 (60,6)	1,74	1,03	2,92	
Colesterol Total						0,839
<200	84 (46,7)	96 (53,3)	1,00			
≥200	27 (48,2)	29 (51,8)	0,94	0,52	1,71	
HDL						0,524
>60	33 (44,0)	42 (56,0)	1,00			
≤60	78 (48,4)	83 (51,6)	0,84	0,48	1,45	
LDL						0,450
<130	91 (46,0)	107 (54,0)	1,00			
≥130	20 (52,6)	18 (47,4)	0,77	0,38	1,53	
VLDL						0,785
<40	104 (47,3)	116 (52,7)	1,00			
≥40	7 (43,8)	9 (56,3)	1,15	0,42	3,21	
Triglicerídeos						0,977
<200	104 (47,1)	117 (52,9)	1,00			
≥200	7 (46,7)	8 (53,3)	1,02	0,36	2,90	
HOMA-IR						0,028
<3	80 (52,6)	72 (47,4)	1,00			
≥3	30 (37,5)	50 (62,5)	1,85	1,07	3,22	
Fibrose						0,004
0-2	97 (51,9)	90 (48,1)	1,00			
3-4	14 (28,6)	35 (71,4)	2,69	1,36	5,33	
Atividade Inflamatória						<0,001
0-1	57 (71,3)	23 (28,8)	1,00			
2-3	54 (34,6)	102 (65,4)	4,68	2,61	8,41	

Continua

Tabela 15 - Fatores associados à presença de esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica (Conclusão)

Variável	Esteatose Ausente n (%)	Esteatose Presente n (%)	OR	IC(95%)		p
				Inferior	Superior	
Siderose						0,272
Ausente	106 (48,0)	115 (52,0)	1,00			
Presente	5 (33,3)	10 (66,7)	1,84	0,61	5,57	
Hipertensão Arterial						0,140
Não	76 (50,7)	74 (49,3)	1,00			
Sim	35 (40,7)	51 (59,3)	1,50	0,88	2,56	
Diabetes Mellitus						0,735
Não	95 (47,5)	105 (52,5)	1,00			
Sim	16 (44,4)	20 (55,6)	1,13	0,55	2,31	
IMC						0,669
<25	45 (48,9)	47 (51,1)	1,00			
≥25	64 (46,0)	75 (54,0)	1,12	0,66	1,90	

Teste qui-quadrado; Análise bivariada; Valor de p significativo quando <0,05

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; HCV: Vírus da hepatite C; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 16 - Análise multivariada dos fatores associados à presença de esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Idade (≥50 anos)	1,28	0,66	2,51	0,464
Sexo (feminino)	2,28	1,21	4,28	0,011
Genótipo 3 HCV	2,74	1,24	6,06	0,013
ALT (alterado)	0,89	0,37	2,12	0,784
AST (alterado)	1,36	0,54	3,43	0,513
GGT (alterado)	1,23	0,63	2,40	0,543
HOMA-IR (≥3)	1,49	0,78	2,88	0,230
Fibrose (3-4)	1,47	0,66	3,30	0,349
Atividade Inflamatória (2-3)	3,61	1,86	7,01	<0,001
Hipertensão Arterial	0,83	0,43	1,60	0,574

Regressão logística múltipla; Valor de p significativo quando <0,05

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; HCV: Vírus da hepatite C; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*

4.3 Genotipagem dos polimorfismos no gene MTTP

Conforme descrito nos Métodos foi realizada a técnica de PCR-RFLP para detecção dos polimorfismos no gene MTTP. Após a extração do DNA das amostras de soro foi realizada a técnica de PCR para a amplificação de um fragmento de 220 pb incluindo o polimorfismo -164T/C (**Figura 7**), de um fragmento de 838 pb incluindo o polimorfismo -400A/T (**Figura 8**), e de um fragmento de 231 pb incluindo o polimorfismo H297Q (**Figura 9**).

Figura 7 - Análise do produto amplificado na PCR para genotipagem do polimorfismo-164T/C no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o padrão de peso molecular de 50 pb e banda de 220 pb de cada amostra

Legenda: pb – pares de base

Figura 8 - Análise do produto amplificado na PCR para genotipagem do polimorfismo -400A/T no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o padrão de peso molecular de 100 pb e banda de 838 pb de cada amostra

Legenda: pb – pares de base

Figura 9 - Análise do produto amplificado na PCR para genotipagem do polimorfismo H297Q no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o padrão de peso molecular de 50 pb e banda de 231 pb de cada amostra
 Legenda: pb – pares de base

Como resultado da técnica de RFLP, foram gerados perfis de fragmentos de DNA que permitiram o reconhecimento do genótipo homozigoto selvagem, do heterozigoto e do homozigoto mutado de cada polimorfismo. Na **Figura 10** pode-se observar os perfis genotípicos do polimorfismo -164T/C gerados pela técnica de PCR-RFLP. O indivíduo 1 é homozigoto mutado CC, pois esse apresenta as duas bandas menores no gel de agarose, um fragmento de 170 pb e outro de 50 pb, ou seja, o fragmento amplificado na PCR foi clivado pela enzima de restrição na presença do alelo C. O indivíduo 2 é heterozigoto TC, isto é, carrega um alelo selvagem e um alelo mutado, pois apresenta as três bandas no gel de agarose: uma banda de 220 pb (correspondente ao alelo selvagem não clivado), uma de 170 pb e outra banda de 50 pb (essas duas correspondentes ao alelo mutado clivado). O indivíduo 3 é homozigoto selvagem TT, ou seja, este possui apenas o fragmento 220 pb.

Figura 10 - Análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado de 220 pb do polimorfismo -164T/C no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o marcador de peso molecular de 50 pb e os três perfis de bandas da RFLP
 Legenda: pb – pares de base

Na **Figura 11** pode-se observar os perfis genotípicos do polimorfismo -400A/T. O indivíduo 1 é homozigoto selvagem AA, pois este possui apenas um fragmento 838 pb. O indivíduo 2 é heterozigoto AT, isto é, carrega um alelo selvagem e um alelo mutado, e apresenta três bandas no gel: uma banda de 838 pb (correspondente ao alelo selvagem não clivado), uma de 494 pb e outra banda de 343 pb (essas duas correspondentes ao alelo mutado clivado). O indivíduo 3 é homozigoto mutado TT, pois esse apresenta as duas bandas de menor peso no gel de agarose, uma banda de 494 pb e outra de 343 pb, ou seja, na presença da mutação a enzima de restrição corta o fragmento amplificado na técnica de PCR.

Figura 11 - Análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado de 838 pb do polimorfismo -400A/T no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o marcador de peso molecular de 100 pb e os três perfis de bandas da RFLP

Legenda: pb – pares de base

Na **Figura 12** pode-se observar os perfis genotípicos gerados na genotipagem o polimorfismo H297Q. O indivíduo 1 é homozigoto mutado QQ, pois esse apresenta as duas bandas de menor tamanho no gel de agarose, um fragmento de 170 pb e outro de 61 pb, ou seja, o fragmento amplificado na PCR foi clivado pela enzima de restrição durante a digestão enzimática. Os indivíduos 2 e 3 são homozigotos selvagem HH, isto é, ambos possuem o fragmento de 231 pb que não foi clivado pela enzima de restrição por não ter a mutação. O indivíduo 4 é heterozigoto HQ, isto é, carrega um alelo selvagem e um alelo mutado, e apresenta três bandas no gel: uma banda de 231 pb (correspondente ao alelo selvagem não clivado), uma de 170 pb e outra banda de 61 pb (essas duas correspondentes ao alelo mutado clivado).

Figura 12 - Análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado de 231 pb do polimorfismo H297Q no gene MTTP. Gel de agarose a 3% mostrando o marcador de peso molecular de 50 pb e os três perfis de bandas da RFLP
 Legenda: pb – pares de base

Foi realizado a genotipagem de todas as amostras incluídas no estudo e a distribuição dos genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado) de cada SNP estudado está apresentada no **Gráfico 1**. O genótipo mais prevalente do SNP -164T/C no gene MTTP foi o homozigoto selvagem TT (48%), do -400A/T foi o heterozigoto AT (50%) e do H297Q foi o heterozigoto HQ (48%). A **Tabela 17** mostra a frequência encontrada dos alelos raros de cada polimorfismo nos participantes do estudo. As distribuições de genótipos dos três SNPs na população estudada estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$).

Gráfico 1 - Distribuição dos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo os genótipos de cada SNP estudado

Tabela 17 - Frequência encontrada do alelo mutado de cada SNP nos 236 pacientes incluídos no estudo e resultado do teste estatístico para o equilíbrio de Hardy-Weinberg

SNP gene MTTP	Frequência do alelo mutado	p
-164T/C	0,30	0,838
-400A/T	0,41	0,694
H297Q	0,50	0,603

Teste qui-quadrado

Os genótipos dos três SNPs no gene MTTP foram analisados segundo os três grupos raciais autodeclarados (branco, negro e pardo) e não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$).

4.4 Fatores avaliados em relação ao polimorfismo -164T/C no gene MTTP

Idade mais avançada, presença de hipertensão arterial, níveis plasmáticos elevados de ferro, ferritina e insulina foram associados estatisticamente com o polimorfismo -164T/C ($p < 0,05$) (**Tabelas 18, 19 e 20**). Elevação no nível de insulina esteve mais presente entre os indivíduos que carregam o alelo mutado (C) do polimorfismo -164T/C nos três diferentes modelos genéticos estudados ($p < 0,05$).

Tabela 18 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo modelo co-dominante do polimorfismo - 164T/C e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -164T/C			p
	TT (n=114) n (%)	TC (n=101) n (%)	CC (n=21) n (%)	
Idade (anos)				0,030
<50	42 (36,8)	22 (21,8)	4 (19,0)	
≥50	72 (63,2)	79 (78,2)	17 (81,0)	
Sexo				0,806
Masculino	49 (43,0)	46 (45,5)	8 (38,1)	
Feminino	65 (57,0)	55 (54,5)	13 (61,9)	
Genótipo 3 HCV				0,264 ^a
Não	98 (86,0)	79 (78,2)	16 (76,2)	
Sim	16 (14,0)	22 (21,8)	5 (23,8)	
HOMA-IR				0,391
<3	76 (67,9)	65 (65,7)	11 (52,4)	
≥3	36 (32,1)	34 (34,3)	10 (47,6)	
ALT				0,396
<41	49 (43,0)	45 (44,6)	6 (28,6)	
≥41	65 (57,0)	56 (55,4)	15 (71,4)	
AST				0,145
<37	59 (51,8)	50 (49,5)	6 (28,6)	
≥37	55 (48,2)	51 (50,5)	15 (71,4)	
GGT				0,978
<61	63 (55,3)	57 (56,4)	12 (57,1)	
≥61	51 (44,7)	44 (43,6)	9 (42,9)	
Ferro				0,100
59-158	80 (71,4)	69 (68,3)	10 (47,6)	
>158	32 (28,6)	32 (31,7)	11 (52,4)	
Ferritina				0,034
30-400	88 (77,9)	63 (62,4)	13 (61,9)	
>400	25 (22,1)	38 (37,6)	8 (38,1)	
Insulina				0,037^a
<25	106 (94,6)	88 (88,9)	16 (76,2)	
≥25	6 (5,4)	11 (11,1)	5 (23,8)	
Glicose				0,799
70-99	78 (68,4)	66 (65,3)	13 (61,9)	
>99	36 (31,6)	35 (34,7)	8 (38,1)	
Carga Viral				0,556
<850.000	44 (39,6)	39 (40,2)	10 (52,6)	
≥850.000	67 (60,4)	58 (59,8)	9 (47,4)	
Fibrose				0,320 ^a
0-2	95 (83,3)	76 (75,2)	16 (76,2)	
3-4	19 (16,7)	25 (24,8)	5 (23,8)	
Siderose				0,643 ^a
Ausente	105 (92,1)	96 (95,0)	20 (95,2)	
Presente	9 (7,9)	5 (5,0)	1 (4,8)	

Continua

Tabela 18 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo modelo co-dominante do polimorfismo - 164T/C e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -164T/C			p
	TT (n=114) n (%)	TC (n=101) n (%)	CC (n=21) n (%)	
Atividade Inflamatória				0,336
0-1	44 (38,6)	30 (29,7)	6 (28,6)	
2-3	70 (61,4)	71 (70,3)	15 (71,4)	
Hipertensão Arterial				0,063
Não	81 (71,1)	58 (57,4)	11 (52,4)	
Sim	33 (28,9)	43 (42,6)	10 (47,6)	
Diabetes Mellitus				0,463 ^a
Não	100 (87,7)	83 (82,2)	17 (81,0)	
Sim	14 (12,3)	18 (17,8)	4 (19,0)	
Disfunção na Tireoide				0,791 ^a
Não	101 (88,6)	87 (86,1)	19 (90,5)	
Sim	13 (11,4)	14 (13,9)	2 (9,5)	
IMC				0,641
<25	42 (37,2)	41 (41,4)	9 (47,4)	
≥25	71 (62,8)	58 (58,6)	10 (52,6)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 19 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -164T/C		p
	TT (n=114) n (%)	TC/CC (n=122) n (%)	
Idade (anos)			0,008
<50	42 (36,8)	26 (21,3)	
≥50	72 (63,2)	96 (78,7)	
Sexo			0,843
Masculino	49 (43,0)	54 (44,3)	
Feminino	65 (57,0)	68 (55,7)	
Genótipo 3 HCV			0,107
Não	98 (86,0)	95 (77,9)	
Sim	16 (14,0)	27 (22,1)	
HOMA-IR			0,469
<3	76 (67,9)	76 (63,3)	
≥3	36 (32,1)	44 (36,7)	
ALT			0,855
<41	49 (43,0)	51 (41,8)	
≥41	65 (57,0)	71 (58,2)	
AST			0,369
<37	59 (51,8)	56 (45,9)	
≥37	55 (48,2)	66 (54,1)	
GGT			0,841
<61	63 (55,3)	69 (56,6)	
≥61	51 (44,7)	53 (43,4)	
Ferro			0,274
59-158	80 (71,4)	79 (64,8)	
>158	32 (28,6)	43 (35,2)	
Ferritina			0,009
30-400	88 (77,9)	76 (62,3)	
>400	25 (22,1)	46 (37,7)	
Insulina			0,038
<25	106 (94,6)	104 (86,7)	
≥25	6 (5,4)	16 (13,3)	
Glicose			0,551
70-99	78 (68,4)	79 (64,8)	
>99	36 (31,6)	43 (35,2)	
Carga Viral			0,690
<850.000	44 (39,6)	49 (42,2)	
≥850.000	67 (60,4)	67 (57,8)	
Fibrose			0,134
0-2	95 (83,3)	92 (75,4)	
3-4	19 (16,7)	30 (24,6)	
Siderose			0,349
Ausente	105 (92,1)	116 (95,1)	
Presente	9 (7,9)	6 (4,9)	

Continua

Tabela 19 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -164T/C		p
	TT (n=114) n (%)	TC/CC (n=122) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,141
0-1	44 (38,6)	36 (29,5)	
2-3	70 (61,4)	86 (70,5)	
Hipertensão Arterial			0,021
Não	81 (71,1)	69 (56,6)	
Sim	33 (28,9)	53 (43,4)	
Diabetes Mellitus			0,219
Não	100 (87,7)	100 (82,0)	
Sim	14 (12,3)	22 (18,0)	
Disfunção na Tireoide			0,689
Não	101 (88,6)	106 (86,9)	
Sim	13 (11,4)	16 (13,1)	
IMC			0,419
<25	42 (37,2)	50 (42,4)	
≥25	71 (62,8)	68 (57,6)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 20 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -164T/C		p
	TT/TC (n=215) n (%)	CC (n=21) n (%)	
Idade (anos)			0,301
<50	64 (29,8)	4 (19,0)	
≥50	151 (70,2)	17 (81,0)	
Sexo			0,591
Masculino	95 (44,2)	8 (38,1)	
Feminino	120 (55,8)	13 (61,9)	
Genótipo 3 HCV			0,552 ^a
Não	177 (82,3)	16 (76,2)	
Sim	38 (17,7)	5 (23,8)	
HOMA-IR			0,184
<3	141 (66,8)	11 (52,4)	
≥3	70 (33,2)	10 (47,6)	
ALT			0,180
<41	94 (43,7)	6 (28,6)	
≥41	121 (56,3)	15 (71,4)	
AST			0,053
<37	109 (50,7)	6 (28,6)	
≥37	106 (49,3)	15 (71,4)	
GGT			0,907
<61	120 (55,8)	12 (57,1)	
≥61	95 (44,2)	9 (42,9)	
Ferro			0,036
59-158	149 (70,0)	10 (47,6)	
>158	64 (30,0)	11 (52,4)	
Ferritina			0,410
30-400	151 (70,6)	13 (61,9)	
>400	63 (29,4)	8 (38,1)	
Insulina			0,035^a
<25	194 (91,9)	16 (76,2)	
≥25	17 (8,1)	5 (23,8)	
Glicose			0,638
70-99	144 (67,0)	13 (61,9)	
>99	71 (33,0)	8 (38,1)	
Carga Viral			0,280
<850.000	83 (39,9)	10 (52,6)	
≥850.000	125 (60,1)	9 (47,4)	
Fibrose			0,778 ^a
0-2	171 (79,5)	16 (76,2)	
3-4	44 (20,5)	5 (23,8)	
Siderose			>0,999 ^a
Ausente	201 (93,5)	20 (95,2)	
Presente	14 (6,5)	1 (4,8)	
Atividade Inflamatória			0,589
0-1	74 (34,4)	6 (28,6)	
2-3	141 (65,6)	15 (71,4)	

Continua

Tabela 20 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -164T/C		p
	TT/TC (n=215) n (%)	CC (n=21) n (%)	
Hipertensão Arterial			0,265
Não	139 (64,7)	11 (52,4)	
Sim	76 (35,3)	10 (47,6)	
Diabetes Mellitus			0,538 ^a
Não	183 (85,1)	17 (81,0)	
Sim	32 (14,9)	4 (19,0)	
Disfunção na Tireoide			>0,999 ^a
Não	188 (87,4)	19 (90,5)	
Sim	27 (12,6)	2 (9,5)	
IMC			0,483
<25	83 (39,2)	9 (47,4)	
≥25	129 (60,8)	10 (52,6)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

As análises de associação de diferentes modelos genéticos do SNP -164T/C com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose hepática estão apresentadas nas **Tabelas 21, 22 e 23**. Não foi observada uma correlação entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e a esteatose hepática com o polimorfismo -164T/C nos pacientes incluídos no estudo ($p>0,05$).

Tabela 21 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo modelo co-dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -164T/C			p
	TT (n=114) n (%)	TC (n=101) n (%)	CC (n=21) n (%)	
Colesterol Total				0,443 ^a
<200	83 (72,8)	81 (80,2)	16 (76,2)	
≥200	31 (27,2)	20 (19,8)	5 (23,8)	
HDL				0,737
>60	37 (32,5)	30 (29,7)	8 (38,1)	
≤60	77 (67,5)	71 (70,3)	13 (61,9)	
LDL				0,951 ^a
<130	96 (84,2)	84 (83,2)	18 (85,7)	
≥130	18 (15,8)	17 (16,8)	3 (14,3)	
VLDL				0,440 ^a
<40	107 (93,9)	95 (94,1)	18 (85,7)	
≥40	7 (6,1)	6 (5,9)	3 (14,3)	
Triglicerídeos				0,360 ^a
<200	107 (93,9)	95 (94,1)	18 (85,7)	
≥200	7 (6,1)	6 (5,9)	3 (14,3)	
Esteatose				0,186
Ausente	54 (47,4)	51 (50,5)	6 (28,6)	
Presente	60 (52,6)	50 (49,5)	15 (71,4)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

Tabela 22 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -164T/C		p
	TT (n=114) n (%)	TC/CC (n=122) n (%)	
Colesterol Total			0,227
<200	83 (72,8)	97 (79,5)	
≥200	31 (27,2)	25 (20,5)	
HDL			0,829
>60	37 (32,5)	38 (31,1)	
≤60	77 (67,5)	84 (68,9)	
LDL			0,900
<130	96 (84,2)	102 (83,6)	
≥130	18 (15,8)	20 (16,4)	
VLDL			0,706
<40	107 (93,9)	113 (92,6)	
≥40	7 (6,1)	9 (7,4)	
Triglicerídeos			0,896
<200	107 (93,9)	114 (93,4)	
≥200	7 (6,1)	8 (6,6)	
Esteatose			0,921
Ausente	54 (47,4)	57 (46,7)	
Presente	60 (52,6)	65 (53,3)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

Tabela 23 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -164T/C e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -164T/C		p
	TT/TC (n=215) n (%)	CC (n=21) n (%)	
Colesterol Total			>0,999 ^a
<200	164 (76,3)	16 (76,2)	
≥200	51 (23,7)	5 (23,8)	
HDL			0,515
>60	67 (31,2)	8 (38,1)	
≤60	148 (68,8)	13 (61,9)	
LDL			>0,999 ^a
<130	180 (83,7)	18 (85,7)	
≥130	35 (16,3)	3 (14,3)	
VLDL			0,159 ^a
<40	202 (94,0)	18 (85,7)	
≥40	13 (6,0)	3 (14,3)	
Triglicerídeos			0,137 ^a
<200	203 (94,4)	18 (85,7)	
≥200	12 (5,6)	3 (14,3)	
Esteatose			0,076
Ausente	105 (48,8)	6 (28,6)	
Presente	110 (51,2)	15 (71,4)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

O polimorfismo -164T/C não apresentou associação estatisticamente significativa com os diferentes graus de esteatose hepática nos três diferentes modelos genéticos estudados ($p>0,05$) (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Descrição dos graus de esteatose hepática segundo o modelo co-dominante, modelo dominante e modelo recessivo do polimorfismo -164T/C

SNP -164T/C	Esteatose			p
	Grau 0 n (%)	Grau 1 n (%)	Grau 2 e 3 n (%)	
Co-dominante				
TT	54 (47,4)	48 (42,1)	12 (10,5)	0,168 ^a
TC	51 (50,5)	35 (34,7)	15 (14,9)	
CC	6 (28,6)	9 (42,9)	6 (28,6)	
Dominante				
TT	54 (47,4)	48 (42,1)	12 (10,5)	0,295
TC/CC	57 (46,7)	44 (36,1)	21 (17,2)	
Recessivo				
TT/TC	105 (48,8)	83 (38,6)	27 (12,6)	0,092 ^a
CC	6 (28,6)	9 (42,9)	6 (28,6)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

Na **Tabela 25** estão apresentados os resultados da análise bivariada das variáveis que podem influenciar a presença de esteatose juntamente com o polimorfismo -164T/C no modelo dominante. A chance de desenvolver esteatose hepática foi maior nos pacientes com o alelo mutado (C) do polimorfismo -164T/C e com o genótipo 3 do HCV, e nos pacientes com o alelo mutado e com alteração no nível plasmático de GGT (p=0,008 e p=0,051, respectivamente).

Tabela 25 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo -164T/C no modelo dominante (TT vs TC/CC)

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Resultados SNP -164T/C	1,03	0,62	1,71	0,921
Idade (≥50 anos) X SNP -164T/C	1,65	0,51	5,40	0,407
Sexo (feminino) X SNP -164T/C	0,72	0,26	2,05	0,543
Genótipo 3 HCV X SNP -164T/C	8,20	1,74	38,73	0,008
ALT X SNP -164T/C	1,18	0,42	3,34	0,755
AST X SNP -164T/C	1,41	0,49	4,02	0,525
GGT X SNP -164T/C	2,86	1,00	8,18	0,051
Colesterol Total X SNP -164T/C	0,46	0,14	1,56	0,214
HDL X SNP -164T/C	0,60	0,20	1,83	0,372
LDL X SNP -164T/C	0,46	0,11	1,87	0,276
VLDL X SNP -164T/C	2,78	0,34	22,90	0,341
Triglicerídeos X SNP -164T/C	2,28	0,27	19,33	0,450
HOMA-IR X SNP -164T/C	1,11	0,37	3,38	0,849
Fibrose X SNP -164T/C	2,33	0,58	9,30	0,231
Atividade Inflamatória X SNP -164T/C	1,98	0,59	6,58	0,266
Siderose X SNP -164T/C	0,96	0,10	9,10	0,968
Hipertensão Arterial X SNP -164T/C	1,71	0,58	5,10	0,334
Diabetes Mellitus X SNP -164T/C	1,50	0,35	6,47	0,584
IMC X SNP -164T/C	0,96	0,33	2,76	0,935

Análise bivariada; Valor de p significativo quando <0,20

IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; IMC: Índice de massa corporal

Na análise multivariada foi observado que a presença de alelo mutado (C) para o polimorfismo -164T/C em conjunto com o genótipo 3 do HCV aumenta em 12,66 vezes a chance de esteatose ($p=0,004$). Pacientes com hepatite C crônica com pelo menos um alelo mutado (C) e com alteração no nível de GGT tem um aumento de 5,43 vezes na chance de desenvolver esteatose hepática ($p=0,006$) (**Tabela 26**).

Tabela 26 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo -164T/C com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Sexo (feminino)	2,06	1,12	3,77	0,020
Genótipo 3 HCV	0,86	0,27	2,71	0,790
HOMA-IR (≥ 3)	1,76	0,91	3,40	0,092
Atividade Inflamatória (2-3)	4,64	2,36	9,11	<0,001
GGT (alterado)	0,59	0,25	1,41	0,231
SNP -164T/C (TC/CC)	0,27	0,11	0,65	0,003
SNP -164T/C (TC/CC) x Genótipo 3 HCV	12,66	2,24	71,63	0,004
SNP -164T/C (TC/CC) x GGT (alterado)	5,43	1,61	18,31	0,006

Regressão logística múltipla; Valor de p significativo quando <0,05

IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; GGT: Gama glutamil transferase; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

4.5 Fatores avaliados em relação ao polimorfismo -400A/T no gene MTTP

As **Tabelas 27, 28 e 29** mostram o resultado da associação do SNP -400A/T, em diferentes modelos genéticos de comparação, com variáveis estudadas nos pacientes com hepatite C crônica. Conforme apresentado nas **Tabelas 27 e 28** a presença de siderose e de diabetes mellitus apresentaram associação com o polimorfismo -400A/T. A siderose esteve mais presente entre os indivíduos genotipados como homozigoto selvagem (AA) ($p=0,030$) e a diabetes esteve mais presente entre os indivíduos que apresentam pelo menos um alelo mutado (T) ($p=0,005$) (**Tabela 28**).

Tabela 27 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo - 400A/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -400A/T			p
	AA (n=81) n (%)	AT (n=117) n (%)	TT (n=38) n (%)	
Idade (anos)				0,919
<50	23 (28,4)	33 (28,2)	12 (31,6)	
≥50	58 (71,6)	84 (71,8)	26 (68,4)	
Sexo				0,457
Masculino	33 (40,7)	50 (42,7)	20 (52,6)	
Feminino	48 (59,3)	67 (57,3)	18 (47,4)	
Genótipo 3 HCV				0,599
Não	68 (84,0)	96 (82,1)	29 (76,3)	
Sim	13 (16,0)	21 (17,9)	9 (23,7)	
HOMA-IR				0,764
<3	50 (63,3)	78 (67,8)	24 (63,2)	
≥3	29 (36,7)	37 (32,2)	14 (36,8)	
ALT				0,536
<41	38 (46,9)	48 (41,0)	14 (36,8)	
≥41	43 (53,1)	69 (59,0)	24 (63,2)	
AST				0,551
<37	43 (53,1)	53 (45,3)	19 (50,0)	
≥37	38 (46,9)	64 (54,7)	19 (50,0)	
GGT				0,749
<61	48 (59,3)	63 (53,8)	21 (55,3)	
≥61	33 (40,7)	54 (46,2)	17 (44,7)	
Ferro				0,568
59-158	57 (72,2)	78 (66,7)	24 (63,2)	
>158	22 (27,8)	39 (33,3)	14 (36,8)	
Ferritina				0,448
30-400	60 (75,0)	79 (67,5)	25 (65,8)	
>400	20 (25,0)	38 (32,5)	13 (34,2)	
Insulina				0,283 ^a
<25	74 (93,7)	104 (90,4)	32 (84,2)	
≥25	5 (6,3)	11 (9,6)	6 (15,8)	
Glicose				0,244
70-99	59 (72,8)	72 (61,5)	26 (68,4)	
>99	22 (27,2)	45 (38,5)	12 (31,6)	
Carga Viral				0,492
<850.000	36 (45,6)	42 (37,2)	15 (42,9)	
≥850.000	43 (54,4)	71 (62,8)	20 (57,1)	
Fibrose				0,314
0-2	67 (82,7)	88 (75,2)	32 (84,2)	
3-4	14 (17,3)	29 (24,8)	6 (15,8)	

Continua

Tabela 27 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo - 400A/T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -400A/T			p
	AA (n=81) n (%)	AT (n=117) n (%)	TT (n=38) n (%)	
Siderose				0,043^a
Ausente	72 (88,9)	114 (97,4)	35 (92,1)	
Presente	9 (11,1)	3 (2,6)	3 (7,9)	
Atividade Inflamatória				0,233
0-1	33 (40,7)	34 (29,1)	13 (34,2)	
2-3	48 (59,3)	83 (70,9)	25 (65,8)	
Hipertensão Arterial				0,583
Não	55 (67,9)	71 (60,7)	24 (63,2)	
Sim	26 (32,1)	46 (39,3)	14 (36,8)	
Diabetes Mellitus				0,014
Não	76 (93,8)	92 (78,6)	32 (84,2)	
Sim	5 (6,2)	25 (21,4)	6 (15,8)	
Disfunção na Tireoide				0,124 ^a
Não	73 (90,1)	98 (83,8)	36 (94,7)	
Sim	8 (9,9)	19 (16,2)	2 (5,3)	
IMC				0,910
<25	31 (38,3)	47 (41,2)	14 (38,9)	
≥25	50 (61,7)	67 (58,8)	22 (61,1)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 28 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -400A/T		p
	AA (n=81) n (%)	AT/TT (n=155) n (%)	
Idade (anos)			0,918
<50	23 (28,4)	45 (29,0)	
≥50	58 (71,6)	110 (71,0)	
Sexo			0,516
Masculino	33 (40,7)	70 (45,2)	
Feminino	48 (59,3)	85 (54,8)	
Genótipo 3 HCV			0,532
Não	68 (84,0)	125 (80,6)	
Sim	13 (16,0)	30 (19,4)	
HOMA-IR			0,608
<3	50 (63,3)	102 (66,7)	
≥3	29 (36,7)	51 (33,3)	
ALT			0,308
<41	38 (46,9)	62 (40,0)	
≥41	43 (53,1)	93 (60,0)	
AST			0,333
<37	43 (53,1)	72 (46,5)	
≥37	38 (46,9)	83 (53,5)	
GGT			0,457
<61	48 (59,3)	84 (54,2)	
≥61	33 (40,7)	71 (45,8)	
Ferro			0,325
59-158	57 (72,2)	102 (65,8)	
>158	22 (27,8)	53 (34,2)	
Ferritina			0,211
30-400	60 (75,0)	104 (67,1)	
>400	20 (25,0)	51 (32,9)	
Insulina			0,239
<25	74 (93,7)	136 (88,9)	
≥25	5 (6,3)	17 (11,1)	
Glicose			0,137
70-99	59 (72,8)	98 (63,2)	
>99	22 (27,2)	57 (36,8)	
Carga Viral			0,303
<850.000	36 (45,6)	57 (38,5)	
≥850.000	43 (54,4)	91 (61,5)	
Fibrose			0,341
0-2	67 (82,7)	120 (77,4)	
3-4	14 (17,3)	35 (22,6)	
Siderose			0,030
Ausente	72 (88,9)	149 (96,1)	
Presente	9 (11,1)	6 (3,9)	

Continua

Tabela 28 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -400A/T		p
	AA (n=81) n (%)	AT/TT (n=155) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,108
0-1	33 (40,7)	47 (30,3)	
2-3	48 (59,3)	108 (69,7)	
Hipertensão Arterial			0,316
Não	55 (67,9)	95 (61,3)	
Sim	26 (32,1)	60 (38,7)	
Diabetes Mellitus			0,005
Não	76 (93,8)	124 (80,0)	
Sim	5 (6,2)	31 (20,0)	
Disfunção na Tireoide			0,415
Não	73 (90,1)	134 (86,5)	
Sim	8 (9,9)	21 (13,5)	
IMC			0,723
<25	31 (38,3)	61 (40,7)	
≥25	50 (61,7)	89 (59,3)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 29 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -400A/T		p
	AA/AT (n=198) n (%)	TT (n=38) n (%)	
Idade (anos)			0,681
<50	56 (28,3)	12 (31,6)	
≥50	142 (71,7)	26 (68,4)	
Sexo			0,223
Masculino	83 (41,9)	20 (52,6)	
Feminino	115 (58,1)	18 (47,4)	
Genótipo 3 HCV			0,341
Não	164 (82,8)	29 (76,3)	
Sim	34 (17,2)	9 (23,7)	
HOMA-IR			0,738
<3	128 (66,0)	24 (63,2)	
≥3	66 (34,0)	14 (36,8)	
ALT			0,451
<41	86 (43,4)	14 (36,8)	
≥41	112 (56,6)	24 (63,2)	
AST			0,864
<37	96 (48,5)	19 (50,0)	
≥37	102 (51,5)	19 (50,0)	
GGT			0,928
<61	111 (56,1)	21 (55,3)	
≥61	87 (43,9)	17 (44,7)	
Ferro			0,489
59-158	135 (68,9)	24 (63,2)	
>158	61 (31,1)	14 (36,8)	
Ferritina			0,558
30-400	139 (70,6)	25 (65,8)	
>400	58 (29,4)	13 (34,2)	
Insulina			0,220 ^a
<25	178 (91,8)	32 (84,2)	
≥25	16 (8,2)	6 (15,8)	
Glicose			0,787
70-99	131 (66,2)	26 (68,4)	
>99	67 (33,8)	12 (31,6)	
Carga Viral			0,805
<850.000	78 (40,6)	15 (42,9)	
≥850.000	114 (59,4)	20 (57,1)	
Fibrose			0,409
0-2	155 (78,3)	32 (84,2)	
3-4	43 (21,7)	6 (15,8)	
Siderose			0,715 ^a
Ausente	186 (93,9)	35 (92,1)	
Presente	12 (6,1)	3 (7,9)	

Continua

Tabela 29 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -400A/T		p
	AA/AT (n=198) n (%)	TT (n=38) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,965
0-1	67 (33,8)	13 (34,2)	
2-3	131 (66,2)	25 (65,8)	
Hipertensão Arterial			0,955
Não	126 (63,6)	24 (63,2)	
Sim	72 (36,4)	14 (36,8)	
Diabetes Mellitus			0,920
Não			
	168 (84,8)	32 (84,2)	
Sim	30 (15,2)	6 (15,8)	
Disfunção na Tireoide			0,185 ^a
Não	171 (86,4)	36 (94,7)	
Sim	27 (13,6)	2 (5,3)	
IMC			0,900
<25	78 (40,0)	14 (38,9)	
≥25	117 (60,0)	22 (61,1)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

As análises de associação de diferentes modelos genéticos do SNP -400A/T com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose hepática podem ser observadas nas **Tabelas 30, 31 e 32**. Não foi observada nenhuma correlação entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e a presença da esteatose hepática com o polimorfismo -400A/T nos pacientes incluídos no estudo ($p>0,05$).

Tabela 30 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -400AT			p
	AA (n=81) n (%)	AT (n=117) n (%)	TT (n=38) n (%)	
Colesterol Total				0,834
<200	60 (74,1)	91 (77,8)	29 (76,3)	
≥200	21 (25,9)	26 (22,2)	9 (23,7)	
HDL				0,565
>60	23 (28,4)	41 (35,0)	11 (28,9)	
≤60	58 (71,6)	76 (65,0)	27 (71,1)	
LDL				0,727
<130	69 (85,2)	96 (82,1)	33 (86,8)	
≥130	12 (14,8)	21 (17,9)	5 (13,2)	
VLDL				0,279 ^a
<40	77 (95,1)	110 (94,0)	33 (86,8)	
≥40	4 (4,9)	7 (6,0)	5 (13,2)	
Triglicerídeos				0,233 ^a
<200	77 (95,1)	111 (94,9)	33 (86,8)	
≥200	4 (4,9)	6 (5,1)	5 (13,2)	
Esteatose				0,345
Ausente	38 (46,9)	59 (50,4)	14 (36,8)	
Presente	43 (53,1)	58 (49,6)	24 (63,2)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

Tabela 31 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -400A/T		p
	AA (n=81) n (%)	AT/TT (n=155) n (%)	
Colesterol Total			0,566
<200	60 (74,1)	120 (77,4)	
≥200	21 (25,9)	35 (22,6)	
HDL			0,420
>60	23 (28,4)	52 (35,5)	
≤60	58 (71,6)	103 (66,5)	
LDL			0,697
<130	69 (85,2)	129 (83,2)	
≥130	12 (14,8)	26 (16,8)	
VLDL			0,416
<40	77 (95,1)	143 (92,3)	
≥40	4 (4,9)	12 (7,7)	
Triglicerídeos			0,519
<200	77 (95,1)	144 (92,9)	
≥200	4 (4,9)	11 (7,1)	
Esteatose			0,979
Ausente	38 (46,9)	73 (47,1)	
Presente	43 (53,1)	82 (52,9)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

Tabela 32 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo -400A/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -400A/T		p
	AA/AT (n=198) n (%)	TT (n=38) n (%)	
Colesterol Total			0,994
<200	151 (76,3)	29 (76,3)	
≥200	47 (23,7)	9 (23,7)	
HDL			0,682
>60	64 (32,3)	11 (28,9)	
≤60	134 (67,7)	27 (71,1)	
LDL			0,590
<130	165 (83,3)	33 (86,8)	
≥130	33 (16,7)	5 (13,2)	
VLDL			0,148 ^a
<40	187 (94,4)	33 (86,8)	
≥40	11 (5,6)	5 (13,2)	
Triglicerídeos			0,073 ^a
<200	188 (94,9)	33 (86,8)	
≥200	10 (5,1)	5 (13,2)	
Esteatose			0,169
Ausente	97 (49,0)	14 (36,8)	
Presente	101 (51,0)	24 (63,2)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

A **Tabela 33** mostra que o SNP -400A/T não apresentou associação estatisticamente significativa com os diferentes graus de esteatose nos três diferentes modelos genéticos estudados ($p>0,05$).

Tabela 33 - Descrição dos graus de esteatose hepática segundo o modelo co-dominante, modelo dominante e modelo recessivo polimorfismo - 400A/T

SNP -400A/T	Esteatose			p
	Grau 0	Grau 1	Grau 2 e 3	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Co-dominante				
AA	38 (46,9)	35 (43,2)	8 (9,9)	0,381
AT	59 (50,4)	40 (34,2)	18 (15,4)	
TT	14 (36,8)	17 (44,7)	7 (18,4)	
Dominante				
AA	38 (46,9)	35 (43,2)	8 (9,9)	0,358
AT/TT	73 (47,1)	57 (36,8)	25 (16,1)	
Recessivo				
AA/AT	97 (49,0)	75 (37,9)	26 (13,1)	0,364
TT	14 (36,8)	17 (44,7)	7 (18,4)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo quando <0,05

Pode ser observado na **Tabela 34** os resultados da análise bivariada das variáveis que podem influenciar a presença de esteatose em conjunto com o polimorfismo -400A/T no modelo dominante. A presença do alelo mutado (T) do polimorfismo -400A/T foi associada com uma redução na chance de desenvolver esteatose em mulheres ($p=0,027$), e com níveis alterados de LDL e de colesterol total ($p=0,016$ e $p=0,010$, respectivamente). A presença do alelo mutado (T) do polimorfismo -400A/T em conjunto com alteração no nível de GGT ou em conjunto com pacientes com infecção pelo genótipo 3 do HCV foram associados, na análise bivariada, com um aumento da chance de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica ($p=0,074$ e $p=0,056$, respectivamente).

Tabela 34 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo -400A/T no modelo dominante (AA vs AT/TT)

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Resultados SNP -400A/T	0,99	0,58	1,70	0,979
Idade (≥50 anos) X SNP -400A/T	0,83	0,25	2,80	0,767
Sexo (feminino) X SNP -400A/T	0,28	0,09	0,87	0,027
Genótipo 3 HCV X SNP -400A/T	4,46	0,97	20,57	0,056
ALT X SNP -400A/T	1,09	0,37	3,25	0,878
AST X SNP -400A/T	1,66	0,55	4,99	0,367
GGT X SNP -400A/T	2,73	0,91	8,21	0,074
Colesterol Total X SNP -400A/T	0,18	0,05	0,67	0,010
HDL X SNP -400A/T	1,02	0,31	3,32	0,974
LDL X SNP -400A/T	0,13	0,03	0,68	0,016
VLDL X SNP -400A/T	0,32	0,02	4,24	0,386
Triglicerídeos X SNP -400A/T	0,26	0,02	3,57	0,314
HOMA-IR X SNP -400A/T	0,95	0,30	3,02	0,929
Fibrose X SNP -400A/T	1,89	0,44	8,13	0,392
Atividade Inflamatória X SNP -400A/T	1,34	0,40	4,52	0,633
Siderose X SNP -400A/T	0,96	0,10	9,24	0,973
Hipertensão Arterial X SNP -400A/T	0,86	0,27	2,73	0,800
Diabetes Mellitus X SNP -400A/T	0,82	0,11	6,08	0,843
IMC X SNP -400A/T	1,03	0,34	3,12	0,959

Análise bivariada; Valor de p significativo quando <0,20

IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; IMC: Índice de massa corporal

Na **Tabela 35** estão apresentados os resultados da regressão logística múltipla das características que podem influenciar a presença de esteatose associada ao HCV em conjunto com o SNP -400A/T. A associação da infecção pelo genótipo 3 do vírus e a presença de alelo mutado (T) aumenta em 7,35 vezes a chance de desenvolver esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica (p=0,032).

Tabela 35 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo -400A/T com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Sexo (feminino)	4,96	1,58	15,54	0,006
Genótipo HCV 3	0,83	0,19	3,58	0,801
HOMA-IR (≥ 3)	1,59	0,81	3,11	0,176
Atividade Inflamatória (2-3)	4,47	2,25	8,90	<0,001
GGT (alterado)	0,90	0,29	2,78	0,849
Colesterol total (alterado)	1,34	0,25	7,19	0,736
LDL (alterado)	1,86	0,24	14,42	0,551
SNP -400A/T (AT/TT)	1,37	0,37	5,10	0,635
SNP -400A/T (AT/TT) x Sexo (feminino)	0,28	0,07	1,11	0,069
SNP -400A/T (AT/TT) x Genótipo 3 HCV	7,35	1,18	45,66	0,032
SNP -400A/T (AT/TT) x GGT (alterado)	2,16	0,57	8,15	0,256
SNP -400A/T (AT/TT) x CT (alterado)	0,54	0,06	4,57	0,568
SNP -400A/T (AT/TT) x LDL (alterado)	0,33	0,03	4,11	0,389

Regressão logística múltipla; Valor de p significativo quando <0,05

IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; GGT: Gama glutamil transferase; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; CT: Colesterol total

4.6 Fatores avaliados em relação ao polimorfismo H297Q no gene MTTP

As **Tabelas 36, 37 e 38** mostram o resultado da associação do SNP H297Q, em diferentes modelos genéticos de comparação, com as variáveis estudadas nos pacientes com hepatite C crônica. O genótipo 3 do HCV, a presença de hipertensão arterial e alteração no nível de insulina foram encontrados em maior proporção nos pacientes que possuíam o alelo mutado (Q) do polimorfismo H297Q ($p < 0,05$).

Tabela 36 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP H297Q			p
	HH (n=62) n (%)	HQ (n=114) n (%)	QQ (n=60) n (%)	
Idade (anos)				0,375
<50	20 (32,3)	28 (24,6)	20 (33,3)	
≥50	42 (67,7)	86 (75,4)	40 (66,7)	
Sexo				0,794
Masculino	25 (40,3)	52 (45,6)	26 (43,3)	
Feminino	37 (59,7)	62 (54,4)	34 (56,7)	
Genótipo 3 HCV				0,021
Não	55 (88,7)	85 (74,6)	53 (88,3)	
Sim	7 (11,3)	29 (25,4)	7 (11,7)	
HOMA-IR				0,764
<3	41 (66,1)	71 (63,4)	40 (69,0)	
≥3	21 (33,9)	41 (36,6)	18 (31,0)	
ALT				0,147
<41	29 (46,8)	41 (36,0)	30 (50,0)	
≥41	33 (53,2)	73 (64,0)	30 (50,0)	
AST				0,268
<37	31 (50,0)	50 (43,9)	34 (56,7)	
≥37	31 (50,0)	64 (56,1)	26 (43,3)	
GGT				0,316
<61	38 (61,3)	58 (50,9)	36 (60,0)	
≥61	24 (38,7)	56 (49,1)	24 (40,0)	
Ferro				0,458
59-158	43 (71,7)	79 (69,3)	37 (61,7)	
>158	17 (28,3)	35 (30,7)	23 (38,3)	
Ferritina				0,387
30-400	42 (68,9)	76 (66,7)	46 (76,7)	
>400	19 (31,1)	38 (33,3)	14 (23,3)	
Insulina				0,071
<25	60 (96,8)	101 (90,2)	49 (84,5)	
≥25	2 (3,2)	11 (9,8)	9 (15,5)	
Glicose				0,855
70-99	43 (69,4)	75 (65,8)	39 (65,0)	
>99	19 (30,6)	39 (34,2)	21 (35,0)	
Carga Viral				0,419
<850.000	27 (45,0)	41 (36,6)	25 (45,5)	
≥850.000	33 (55,0)	71 (63,4)	30 (54,5)	
Fibrose				0,528
0-2	50 (80,6)	87 (76,3)	50 (83,3)	
3-4	12 (19,4)	27 (23,7)	10 (16,7)	
Siderose				0,839 ^a
Ausente	59 (95,2)	106 (93,0)	56 (93,3)	
Presente	3 (4,8)	8 (7,0)	4 (6,7)	

Continua

Tabela 36 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP H297Q			p
	HH (n=62) n (%)	HQ (n=114) n (%)	QQ (n=60) n (%)	
Atividade Inflamatória				0,124
0-1	22 (35,5)	32 (28,1)	26 (43,3)	
2-3	40 (64,5)	82 (71,9)	34 (56,7)	
Hipertensão Arterial				0,034
Não	47 (75,8)	64 (56,1)	39 (65,0)	
Sim	15 (24,2)	50 (43,9)	21 (35,0)	
Diabetes Mellitus				0,182
Não	56 (90,3)	97 (85,1)	47 (78,3)	
Sim	6 (9,7)	17 (14,9)	13 (21,7)	
Disfunção na Tireoide				0,715
Não	55 (88,7)	98 (86,0)	54 (90,0)	
Sim	7 (11,3)	16 (14,0)	6 (10,0)	
IMC				0,734
<25	27 (43,5)	42 (37,5)	23 (40,4)	
≥25	35 (56,5)	70 (62,5)	34 (59,6)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 37 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP H297Q		p
	HH (n=62) n (%)	HQ/QQ (n=174) n (%)	
Idade (anos)			0,486
<50	20 (32,3)	48 (27,6)	
≥50	42 (67,7)	126 (72,4)	
Sexo			0,539
Masculino	25 (40,3)	78 (44,8)	
Feminino	37 (59,7)	96 (55,2)	
Genótipo 3 HCV			0,100
Não	55 (88,7)	138 (79,3)	
Sim	7 (11,3)	36 (20,7)	
HOMA-IR			0,906
<3	41 (66,1)	111 (65,3)	
≥3	21 (33,9)	59 (34,7)	
ALT			0,414
<41	29 (46,8)	71 (40,8)	
≥41	33 (53,2)	103 (59,2)	
AST			0,816
<37	31 (50,0)	84 (48,3)	
≥37	31 (50,0)	90 (51,7)	
GGT			0,322
<61	38 (61,3)	94 (54,0)	
≥61	24 (38,7)	80 (46,0)	
Ferro			0,474
59-158	43 (71,7)	116 (66,7)	
>158	17 (28,3)	58 (33,3)	
Ferritina			0,853
30-400	42 (68,9)	122 (70,1)	
>400	19 (31,1)	52 (29,9)	
Insulina			0,049
<25	60 (96,8)	150 (88,2)	
≥25	2 (3,2)	20 (11,8)	
Glicose			0,582
70-99	43 (69,4)	114 (65,5)	
>99	19 (30,6)	60 (34,5)	
Carga Viral			0,459
<850.000	27 (45,0)	66 (39,5)	
≥850.000	33 (55,0)	101 (60,5)	
Fibrose			0,750
0-2	50 (80,6)	137 (78,7)	
3-4	12 (19,4)	37 (21,3)	
Siderose			0,765 ^a
Ausente	59 (95,2)	162 (93,1)	
Presente	3 (4,8)	12 (6,9)	

Continua

Tabela 37 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP H297Q		p
	HH (n=62) n (%)	HQ/QQ (n=174) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,759
0-1	22 (35,5)	58 (33,3)	
2-3	40 (64,5)	116 (66,7)	
Hipertensão Arterial			0,020
Não	47 (75,8)	103 (59,2)	
Sim	15 (24,2)	71 (40,8)	
Diabetes Mellitus			0,155
Não	56 (90,3)	144 (82,8)	
Sim	6 (9,7)	30 (17,2)	
Disfunção na Tireoide			0,780
Não	55 (88,7)	152 (87,4)	
Sim	7 (11,3)	22 (12,6)	
IMC			0,484
<25	27 (43,5)	65 (38,5)	
≥25	35 (56,5)	104 (61,5)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 38 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP H297Q		p
	HH/HQ (n=176) n (%)	QQ (n=60) n (%)	
Idade (anos)			0,371
<50	48 (27,3)	20 (33,3)	
≥50	128 (72,7)	40 (66,7)	
Sexo			0,955
Masculino	77 (43,8)	26 (43,3)	
Feminino	99 (56,3)	34 (56,7)	
Genótipo 3 HCV			0,128
Não	140 (79,5)	53 (88,3)	
Sim	36 (20,5)	7 (11,7)	
HOMA-IR			0,523
<3	112 (64,4)	40 (69,0)	
≥3	62 (35,6)	18 (31,0)	
ALT			0,166
<41	70 (39,8)	30 (50,0)	
≥41	106 (60,2)	30 (50,0)	
AST			0,154
<37	81 (46,0)	34 (56,7)	
≥37	95 (54,0)	26 (43,3)	
GGT			0,462
<61	96 (54,5)	36 (60,0)	
≥61	80 (45,5)	24 (40,0)	
Ferro			0,227
59-158	122 (70,1)	37 (61,7)	
>158	52 (29,9)	23 (38,3)	
Ferritina			0,179
30-400	118 (67,4)	46 (76,7)	
>400	57 (32,6)	14 (23,3)	
Insulina			0,070
<25	161 (92,5)	49 (84,5)	
≥25	13 (7,5)	9 (15,5)	
Glicose			0,772
70-99	118 (67,0)	39 (65,0)	
>99	58 (33,0)	21 (35,0)	
Carga Viral			0,437
<850.000	68 (39,5)	25 (45,5)	
≥850.000	104 (60,5)	30 (54,5)	
Fibrose			0,365
0-2	137 (77,8)	50 (83,3)	
3-4	39 (22,2)	10 (16,7)	
Siderose			>0,999 ^a
Ausente	165 (93,8)	56 (93,3)	
Presente	11 (6,3)	4 (6,7)	

Continua

Tabela 38 - Distribuição das variáveis estudadas nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo recessivo do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP H297Q		p
	HH/HQ (n=176) n (%)	QQ (n=60) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,074
0-1	54 (30,7)	26 (43,3)	
2-3	122 (69,3)	34 (56,7)	
Hipertensão Arterial			0,788
Não	111 (63,1)	39 (65,0)	
Sim	65 (36,9)	21 (35,0)	
Diabetes Mellitus			0,110
Não	153 (86,9)	47 (78,3)	
Sim	23 (13,1)	13 (21,7)	
Disfunção na Tireoide			0,532
Não	153 (86,9)	54 (90,0)	
Sim	23 (13,1)	6 (10,0)	
IMC			0,926
<25	69 (39,7)	23 (40,4)	
≥25	105 (60,3)	34 (59,6)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; IMC: Índice de massa corporal

As análises de associações de diferentes modelos genéticos do SNP H297Q com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose hepática estão apresentadas nas **Tabelas 39, 40 e 41**. Não foi observada correlação entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e a esteatose hepática com o polimorfismo H297Q nos pacientes com hepatite C crônica ($p>0,05$).

Tabela 39 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 pacientes com hepatite C crônica segundo o modelo co-dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP H297Q			p
	HH (n=62) n (%)	HQ (n=114) n (%)	QQ (n=60) n (%)	
Colesterol Total				0,722
<200	47 (75,8)	85 (74,6)	48 (80,0)	
≥200	15 (24,2)	29 (25,4)	12 (20,0)	
HDL				0,970
>60	19 (30,6)	37 (32,5)	19 (31,7)	
≤60	43 (69,4)	77 (67,5)	41 (68,3)	
LDL				0,556
<130	51 (82,3)	94 (82,5)	53 (88,3)	
≥130	11 (17,7)	20 (17,5)	7 (11,7)	
VLDL				0,860 ^a
<40	58 (93,5)	107 (93,9)	55 (91,7)	
≥40	4 (6,5)	7 (6,1)	5 (8,3)	
Triglicerídeos				0,730 ^a
<200	59 (95,2)	107 (93,9)	55 (91,7)	
≥200	3 (4,8)	7 (6,1)	5 (8,3)	
Esteatose				0,855
Ausente	31 (50,0)	52 (45,6)	28 (46,7)	
Presente	31 (50,0)	62 (54,4)	32 (53,3)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhanças; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

Tabela 40 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 participantes do estudo segundo o modelo dominante do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP H297Q		p
	HH (n=62) n (%)	HQ/QQ (n=174) n (%)	
Colesterol Total			0,920
<200	47 (75,8)	133 (76,4)	
≥200	15 (24,2)	41 (23,6)	
HDL			0,823
>60	19 (30,6)	56 (32,2)	
≤60	43 (69,4)	118 (67,8)	
LDL			0,682
<130	51 (82,3)	147 (84,5)	
≥130	11 (17,7)	27 (15,5)	
VLDL			>0,999 ^a
<40	58 (93,5)	162 (93,1)	
≥40	4 (6,5)	12 (6,9)	
Triglicerídeos			0,765 ^a
<200	59 (95,2)	162 (93,1)	
≥200	3 (4,8)	12 (6,9)	
Esteatose			0,586
Ausente	31 (50,0)	80 (46,0)	
Presente	31 (50,0)	94 (54,0)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

Tabela 41 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos 236 participantes do estudo segundo o modelo recessivo do polimorfismo H297Q e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP H297Q		p
	HH/HQ (n=176) n (%)	QQ (n=60) n (%)	
Colesterol Total			0,432
<200	132 (75,0)	48 (80,0)	
≥200	44 (25,0)	12 (20,0)	
HDL			0,983
>60	56 (31,8)	19 (31,7)	
≤60	120 (68,2)	41 (68,3)	
LDL			0,279
<130	145 (82,4)	53 (88,3)	
≥130	31 (17,6)	7 (11,7)	
VLDL			0,561 ^a
<40	165 (93,8)	55 (91,7)	
≥40	11 (6,3)	5 (8,3)	
Triglicerídeos			0,540 ^a
<200	166 (94,3)	55 (91,7)	
≥200	10 (5,7)	5 (8,3)	
Esteatose			0,947
Ausente	83 (47,2)	28 (46,7)	
Presente	93 (52,8)	32 (53,3)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo quando <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

A **Tabela 42** mostra que o SNP H297Q não apresentou associação estatisticamente significativa com os diferentes graus de esteatose nos três diferentes modelos genéticos estudados ($p>0,05$).

Tabela 42 - Descrição dos graus de esteatose hepática segundo o modelo co-dominante, modelo dominante e modelo recessivo polimorfismo H297Q

SNP H297Q	Esteatose			p
	Grau 0	Grau 1	Grau 2 e 3	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Co-dominante				
HH	31 (50,0)	20 (32,3)	11 (17,7)	0,723
HQ	52 (45,6)	48 (42,1)	14 (12,3)	
QQ	28 (46,7)	24 (40,0)	8 (13,3)	
Dominante				
HH	31 (50,0)	20 (32,3)	11 (17,7)	0,371
HQ/QQ	80 (46,0)	72 (41,4)	22 (12,6)	
Recessivo				
HH/HQ	83 (47,2)	68 (38,6)	25 (14,2)	0,976
QQ	28 (46,7)	24 (40,0)	8 (13,3)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo quando <0,05

Na **Tabela 43** pode ser observado os resultados da análise bivariada das variáveis que influenciam a presença de esteatose associada ao HCV com o polimorfismo H297Q no modelo dominante. A presença do alelo mutado (Q) do polimorfismo foi associada com uma redução na chance de esteatose em mulheres e em pacientes com o nível alterado de colesterol total ($p=0,127$ e $p=0,068$, respectivamente). Alterações nos níveis das enzimas hepáticas (ALT e AST), fibrose de moderada a avançada e atividade inflamatória de intensidade moderada a avançada em conjunto com a presença do alelo mutado do polimorfismo H297Q no gene MTTP foram associados com uma maior chance de desenvolver esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica ($p<0,20$).

Tabela 43 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo H297Q no modelo dominante (HH vs HQ/QQ)

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Resultados SNP H297Q	1,18	0,66	2,10	0,586
Idade (≥50 anos) X SNP H297Q	0,72	0,20	2,60	0,611
Sexo (feminino) X SNP H297Q	0,38	0,11	1,31	0,127
Genótipo 3 HCV X SNP H297Q	0,32	0,03	3,21	0,330
ALT X SNP H297Q	2,31	0,72	7,47	0,161
AST X SNP H297Q	4,09	1,26	13,28	0,019
GGT X SNP H297Q	1,00	0,30	3,30	0,994
Colesterol Total X SNP H297Q	0,27	0,07	1,10	0,068
HDL X SNP H297Q	1,46	0,41	5,17	0,557
LDL X SNP H297Q	0,51	0,11	2,39	0,391
VLDL X SNP H297Q	0,26	0,02	3,53	0,312
Triglicerídeos X SNP H297Q	0,41	0,03	6,17	0,517
HOMA-IR X SNP H297Q	1,28	0,37	4,45	0,695
Fibrose X SNP H297Q	4,02	0,88	18,37	0,073
Atividade Inflamatória X SNP H297Q	2,59	0,72	9,32	0,147
Siderose X SNP H297Q	0,85	0,06	13,35	0,911
Hipertensão Arterial X SNP H297Q	0,83	0,22	3,15	0,788
Diabetes Mellitus X SNP H297Q	0,45	0,06	3,14	0,421
IMC X SNP H297Q	0,97	0,30	3,16	0,959

Análise bivariada; Valor de p significativo quando <0,20

IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; IMC: Índice de massa corporal

Na regressão logística múltipla foi observado que o polimorfismo H297Q não apresentou influência em conjunto com as características avaliadas estatisticamente significativas anteriormente na análise bivariada, na presença da esteatose hepática ($p>0,05$) (**Tabela 44**).

Tabela 44 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo H297Q com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Sexo (feminino)	3,61	0,98	13,27	0,054
Genótipo 3 HCV	2,61	1,16	5,87	0,020
HOMA-IR (≥ 3)	1,44	0,75	2,76	0,278
Atividade Inflamatória (2-3)	3,53	1,80	6,91	<0,001
ALT (alterado)	0,78	0,14	4,35	0,772
AST (alterado)	0,78	0,14	4,43	0,780
Colesterol total (alterado)	1,70	0,45	6,40	0,435
Fibrose (3-4)	1,26	0,26	6,06	0,776
SNP H297Q (HQ/QQ)	1,11	0,27	4,62	0,885
SNP H297Q (HQ/QQ) x Sexo (feminino)	0,53	0,12	2,36	0,403
SNP H297Q (HQ/QQ) x ALT (alterado)	1,22	0,16	9,11	0,845
SNP H297Q (HQ/QQ) x AST (alterado)	2,40	0,31	18,59	0,402
SNP H297Q (HQ/QQ) x CT (alterado)	0,35	0,07	1,65	0,184
SNP H297Q (HQ/QQ) x Fibrose (2-3)	1,55	0,25	9,74	0,641

Regressão logística múltipla; Valor de p significativo quando <0,05

IC: Intervalo de confiança; OR: *Odds ratio*; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; CT: Colesterol total

4.7 Representação gráfica dos principais achados

Na regressão logística múltipla, **Tabela 26**, foi observada uma associação estaticamente significativa entre a presença do alelo mutado (C) do polimorfismo -164T/C no gene MTTP em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV com a esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica quando comparado com os pacientes que não tinham essas duas características associadas, esse resultado pode ser melhor observado no **Gráfico 2**. Os pacientes com a presença do alelo mutado (C) do polimorfismo -164T/C em conjunto com alterações no nível de GGT, também, apresentaram uma maior chance de desenvolver esteatose hepática quando comparado com

os pacientes que não tinham essas características associadas, esse resultado pode ser melhor observado no **Gráfico 3**.

Gráfico 2 - Representação gráfica da frequência dos pacientes com esteatose hepática e com os genótipos do polimorfismo -164T/C no gene MTTP em relação ao genótipo do HCV

Gráfico 3 - Representação gráfica da frequência dos pacientes com esteatose hepática e com os genótipos do polimorfismo -164T/C no gene MTTP em relação ao nível plasmático de GGT

Em relação ao polimorfismo -400A/T no gene MTTP, na regressão logística múltipla apresentada na **Tabela 35**, foi observada uma associação estaticamente significativa entre a presença do alelo mutado (T) em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV com a presença de esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica. A frequência de pacientes com esteatose e com os genótipos desse polimorfismo em relação ao genótipo do HCV pode ser observada no **Gráfico 4**.

Gráfico 4 - Representação gráfica da frequência dos pacientes com esteatose hepática e com os genótipos do polimorfismo -400A/T no gene MTTP em relação ao genótipo do HCV

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi capaz de padronizar três ensaios de PCR-RFLP visando à detecção de três diferentes SNPs no gene MTTP e de realizar a genotipagem desses SNPs nas 236 amostras biológicas de pacientes com hepatite C crônica, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP. Assim, foi possível detectar a frequência dos polimorfismos -164T/C, -400A/T e H297Q, e avaliar a relação deles com características clínicas e laboratoriais e com a susceptibilidade para esteatose hepática. Esse tema ainda é inédito na literatura atual e relevante para identificar se a detecção de variantes genéticas seriam possíveis marcadores importantes para diagnosticar precocemente a esteatose hepática.

A frequência encontrada do alelo mutado (C) do polimorfismo -164T/C no gene MTTP na presente amostra de pacientes brasileiros com infecção crônica pelo HCV foi semelhante com a descrita por Herrmann et al. (1998), por Berthier et al. (2004) e por Cai et al. (2011). Para o polimorfismo -400A/T, a frequência observada do alelo mutado (T) no presente estudo foi ligeiramente maior do que a encontrada por Karpe et al. (1998) e Ledmyr et al. (2002), é interessante ressaltar que a população desses estudos se origina do norte da Europa. Já o estudo de Yang et al. (2008), avaliou o polimorfismo H297Q na população chinesa e a frequência encontrada do alelo mutado desse polimorfismo foi superior a encontrada no presente estudo, essa divergência provavelmente é atribuível as diferenças na origem das populações, com diferentes *backgrounds* genéticos.

A MTTP desempenha um papel importante no metabolismo lipídico. Alguns estudos relataram que variantes genéticas no gene MTTP estavam associadas à alteração no nível de LDL (Karpe et al., 1998; Miyaaki; Nakao, 2017; Gonzalez-Becerra et al., 2018). No presente estudo, não foi observada uma correlação entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e os diferentes modelos genéticos testados dos SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP em pacientes com hepatite C crônica, assim como também não

foi encontrada associação quando os três SNPs foram avaliados com os diferentes graus de esteatose hepática. Previamente, Herrmann et al. (1998), avaliaram a relação dos polimorfismos -164T/C e -400A/T com os perfis lipídicos e a doença coronariana em 622 pacientes com história prévia de infarto do miocárdio e em 728 controles saudáveis. Nenhuma das variantes mostrou associação com estenose coronária avaliada por angiografia ou com alterações nos perfis lipídicos plasmáticos (Herrmann et al., 1998). Entretanto, um estudo mais recente identificou uma associação entre os pacientes com diabetes genotipados como heterozigotos (AT) para o SNP -400A/T e uma redução dos níveis de LDL, VLDL e colesterol total. Porém, nesse trabalho o SNP -164T/C não foi associado com alterações lipídicas (Phillips et al., 2004). Portanto, é interessante estudar outros polimorfismos em diferentes regiões do gene MTTP, a fim de avaliar se outras variantes genéticas estão associadas com alterações nos níveis de lipídeos tendo em vista que mutações na região codificadora desse gene também podem causar abetalipoproteinemia, uma doença genética rara caracterizada por uma ausência de lipoproteínas plasmáticas que contêm ApoB e por baixas concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol.

Além disso, foi descrito na literatura que variantes genéticas no gene MTTP podem reduzir a expressão da proteína MTTP no coração e no fígado, o que pode aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares em humanos (Karpe et al., 1998; Aminoff et al., 2010; di Giuseppe et al., 2013). No presente estudo, foi observada uma associação da presença de hipertensão arterial com o SNP -164T/C no modelo dominante (TT vs TC/CC) e com o SNP H297Q no modelo co-dominante (HH vs HQ vs QQ) e no modelo dominante (HH vs HQ/qq) nos pacientes incluídos com hepatite C crônica. Essa relação de uma maior frequência dos polimorfismos estudados nos pacientes com hipertensão arterial é só um indício que esses SNPs podem estar relacionados com o desenvolvimento de alguma doença cardiovascular. Porém, o presente estudo não realizou análises específicas para responder essa questão visto que não fazia parte dos objetivos propostos.

A hepatite C, além de ser uma doença viral, pode ser considerada uma doença metabólica, pois o vírus interage com o metabolismo lipídico e com o

metabolismo da glicose. Alguns estudos descreveram alta prevalência de resistência à insulina em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, entretanto os mecanismos que predisõem resistência à insulina ainda não são completamente compreendidos (Eslam et al., 2011). A prevalência encontrada de resistência à insulina em pacientes brasileiros com hepatite C foi de 62,1%, isso indica que essa população tem uma maior chance de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (Villar et al., 2017). Com o propósito de entender melhor esses mecanismos, variantes genéticas no hospedeiro foram estudadas e alguns trabalhos encontraram associação de polimorfismos genéticos com alteração no nível de insulina e com resistência à insulina, tanto em pacientes com hepatite C crônica como nos pacientes coinfectados HIV-HCV (Petta et al., 2013; Zheng et al., 2013; Jiménez-Sousa et al., 2014).

Polimorfismos no gene MTTP parecem ter importantes implicações no nível de insulina. Ledmyr et al. (2002), avaliaram indivíduos saudáveis e encontraram uma associação do alelo mutado dos SNPs -493G/T, -164T/C, I128T e Q95H no gene MTTP com um aumento no nível de insulina. Entretanto, o SNP H297Q no gene MTTP não foi associado com o nível de insulina nessa população. No presente estudo, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o SNP -164T/C no gene MTTP com elevações no nível sérico de insulina nos três diferentes modelos genéticos estudados (modelo co-dominante, dominante e recessivo), assim como o SNP H297Q, que foi associado com alto nível de insulina no modelo dominante (HH vs HQ/QQ). Observamos, também, que o alelo mutado (T) do SNP -400A/T esteve mais presente entre os pacientes com hepatite C crônica e com o diagnóstico de diabetes mellitus (modelos co-dominante e dominante). O respectivo estudo não teve como objetivo avaliar os mecanismos patogênicos dos genótipos dos polimorfismos no gene MTTP relacionados com a resistência à insulina, mas é possível especularmos que a associação da infecção crônica pelo HCV com fatores do hospedeiro pode influenciar o metabolismo da glicose, assim como, o desenvolvimento de comorbidades relacionadas ao HCV, como a resistência à insulina.

A sobrecarga de ferro no fígado é comumente encontrada em pacientes com o diagnóstico de hepatite C crônica e pode influenciar negativamente o

prognóstico da doença. Fatores do hospedeiro exercem um papel importante na fisiopatologia da sobrecarga de ferro nesses pacientes (Valenti et al., 2007). Algumas variantes genéticas foram identificadas e associadas com alterações nos níveis séricos de ferro e de ferritina em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, esses achados ajudam a compreender melhor o complexo heterogêneo da sobrecarga de ferro na hepatite C (Lebray et al., 2004; Rudnicka et al., 2017). No presente estudo, nível elevado de ferro foi mais presente entre os indivíduos genotipados como homozigoto mutado para o SNP -164T/C (TT/TC vs CC) e nível elevado de ferritina foi mais presente entre os pacientes com pelo menos um alelo mutado do SNP -164T/C (TT vs TC vs CC; TT vs TC/CC). A presença de siderose hepática apresentou associação com o SNP -400A/T no gene MTTP, onde a siderose esteve mais presente entre os indivíduos homozigotos selvagens (AA vs AT vs TT; AA vs AT/TT). Até onde se sabe, não existem dados na literatura sobre a relação de polimorfismos no gene MTTP com a sobrecarga de ferro em pacientes com hepatite C crônica. Por essa razão, se faz necessário a realização de novos estudos com outros polimorfismos no gene MTTP e em populações maiores de pacientes cronicamente infectados pelos HCV para comprovar a existência dessa relação.

A esteatose hepática é uma característica histológica comum entre os pacientes cronicamente infectados pelo HCV e, também, afeta significativamente a progressão da doença (Mirandola et al., 2010). No presente estudo, a esteatose hepática esteve presente em 53% dos pacientes incluídos, e essa prevalência da esteatose em pacientes com hepatite C foi semelhante com a prevalência média de 55% descrita no trabalho de Asselah et al. (2006). Fatores do hospedeiro e do vírus estão envolvidos no desenvolvimento e na gravidade da esteatose associada ao HCV. Na análise multivariada realizada para avaliar os fatores associados à esteatose hepática em todos os pacientes incluídos no estudo, encontramos a associação entre o gênero, o genótipo 3 do HCV e a atividade inflamatória de moderada a alta intensidade com a presença de esteatose. Em relação à distribuição por gênero, nosso estudo mostrou que a presença de esteatose em pacientes com hepatite C crônica foi mais frequente em mulheres do que em homens. Outros

estudos, também, demonstraram uma associação entre o sexo feminino e a presença de esteatose (Irimia et al., 2014; Khan et al., 2015). Acredita-se que esse resultado pode ter sido influenciado pela combinação de diversos fatores esteatogênicos.

Rubbia-Brandt et al. (2004) e Leandro et al. (2006), avaliaram características que poderiam estar associadas à esteatose e fibrose hepáticas em uma grande amostra de pacientes com hepatite C crônica. Em ambos os estudos, a esteatose foi independentemente associada com genótipo 3 do HCV, presença de fibrose, IMC elevado e idade avançada. Leandro et al. (2006), identificaram que a presença de atividade inflamatória estava independentemente associada com a esteatose e fibrose hepáticas ($p=0,001$ e $p<0,001$, respectivamente). Essa associação corrobora com os resultados da nossa análise multivariada, onde foi observada uma associação da presença de esteatose hepática com a atividade inflamatória de moderada a alta intensidade nos pacientes cronicamente infectados pelo HCV.

A esteatose hepática continua sendo uma condição patológica importante mesmo em pacientes que alcançam RVS na era dos DAAs (Kawaguchi et al., 2017). Nirei et al. (2017) avaliaram a esteatose em longo prazo em 282 pacientes com hepatite C crônica ou com cirrose hepática que atingiram a RVS. Os pacientes foram divididos em dois grupos com base na ausência ou presença de esteatose hepática. Elevações nos níveis de ALT, AST, GGT e plaquetas foram significativamente maiores nos pacientes com esteatose do que nos pacientes sem esteatose. O grau de fibrose hepática e o infiltrado de células inflamatórias, também, foram associados com a presença de esteatose hepática. A incidência de HCC foi de 1,8% do grupo sem esteatose e 7,0% no grupo com esteatose hepática. A presença de esteatose hepática foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento em longo prazo do HCC em pacientes com RVS ($p=0,031$). Desse modo, concluíram que a presença de esteatose influenciou os níveis séricos das enzimas hepáticas e das plaquetas e, além disso, a esteatose parece afetar os resultados em longo prazo dos pacientes com RVS (Nirei et al., 2017).

Um estudo conduzido em uma população chinesa com 580 pacientes com DHGNA e com 580 controles sadios, demonstrou que o SNP -164T/C (rs1800804) foi associado com um aumento da susceptibilidade de desenvolver DHGNA, enquanto outros dois SNPs no gene MTTP (rs1057613 e rs3805335) foram associados com uma diminuição do risco de DHGNA (Peng et al., 2014). Alguns SNPs no gene MTTP foram previamente associados com a esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica (Zampino et al., 2008; Mirandola et al., 2009; Magri et al., 2017). No presente estudo, foi encontrada uma associação do genótipo TC/CC do SNP -164T/C com a presença esteatose hepática em pacientes infectados pelo genótipo 3 do HCV quando comparado com pacientes sem essas características associadas. Esse resultado difere de uma coorte realizada na Suíça, na qual foram incluídos 183 pacientes infectados com o genótipo 3 do HCV, e não foi encontrada na análise multivariada uma associação entre o SNP -164T/C e o desenvolvimento de esteatose (Cai et al., 2011). Porém, dados relacionados ao SNP -164T/C em pacientes com hepatite C crônica ainda são bastante escassos na literatura.

Na análise bivariada realizada para avaliar os fatores associados à esteatose hepática na população total do estudo, a esteatose hepática foi associada com nível elevado de GGT, entretanto após a regressão logística múltipla, essa associação não foi observada. Esse resultado é similar aos achados de Silva et al. (2004), um estudo que avaliou a associação de alteração no nível de GGT com características de pacientes brasileiros com hepatite C crônica, e aos achados de Hwang et al. (2001), que avaliou 106 pacientes chineses com hepatite C crônica e correlacionam a esteatose com dados laboratoriais e histológicos. Na análise multivariada do presente estudo do SNP em conjunto com características, foi observada uma associação entre a presença do genótipo TC/CC do SNP -164T/C com nível elevado de GGT e a presença de esteatose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo HCV. Estudos que observaram SNPs no gene MTTP em pacientes com hepatite C crônica não testaram essa associação (Zampino et al., 2008; Mirandola et al., 2009; Cai et al., 2011). Portanto, mais estudos são necessários para confirmar essa associação.

A esteatose hepática, também, foi associada ao genótipo AT/TT do SNP -400A/T (rs1800803) no gene MTTP em pacientes com genótipo 3 do HCV. O risco de esteatose foi 7,35 vezes maior em pacientes com o genótipo 3 do HCV e portadores do alelo mutado (T) de SNP -400A/T do que em pacientes sem estas características associadas. Cai et al. (2011), analisaram 31 SNPs em 1068 pacientes com hepatite C para esclarecer o papel de polimorfismos genéticos do hospedeiro na esteatose associada ao HCV e observaram que a variante mutada (T) do SNP -400A/T está associada ao aumento do risco de esteatose entre pacientes com genótipo 3 do vírus, esse resultado corrobora com os nossos achados. Essa associação significativa, observada no presente estudo, entre os SNPs -164T/C e -400A/T no gene MTTP e o genótipo 3 do HCV, sugere-se que fatores do hospedeiro em conjunto com fatores virais podem aumentar o risco de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

O SNP H297Q no gene MTTP apresenta uma substituição da histidina pela glutamina no sítio 297. Na população geral, o SNP H297Q foi associado com baixo IMC, circunferência da cintura e nível reduzido de colesterol total em mulheres (Böhme et al., 2008). Este SNP também foi associado com a suscetibilidade a DHGNA por Hsiao et al. (2015). No presente estudo, o SNP H297Q não foi significativamente associado à presença de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica, mesmo quando foi analisado em conjunto com outras características. Esse resultado difere da associação encontrada dos SNPs -164T/C e -400A/T, no presente estudo, e do SNP -493G/T no gene MTTP, em outros estudos, com a presença da esteatose hepática na população com hepatite C (Zampino et al., 2008; Mirandola et al., 2009; Magri et al., 2017). Esses SNPs estão localizados no mesmo gene, mas cada um deles tem uma posição genética distinta e às vezes gera mudanças nos aminoácidos, que podem ou não influenciar diversas patologias como a esteatose hepática.

O presente trabalho não pretende ser um estudo definitivo sobre identificar fatores genéticos relacionados com desenvolvimento de esteatose hepática associada à infecção crônica por HCV, tendo em vista que outras variantes genéticas relevantes no hospedeiro precisam ser testadas. Além

disso, novos estudos avaliando outros SNPs e com amostras maiores são necessários para elucidar a participação conjunta dos determinantes genéticos do hospedeiro no desenvolvimento da esteatose hepática e em alterações nos níveis plasmáticos de lipídeos. Contudo, o pequeno número de pacientes infectados pelo genótipo 3 do HCV é uma das limitações deste estudo, porém é um reflexo do cenário brasileiro onde o genótipo 1 do HCV é o mais prevalente. Outra limitação do presente trabalho, é que a coleta de sangue para a realização dos exames laboratoriais não foi feita no mesmo dia da realização da biópsia hepática, apesar de um dos critérios de inclusão desse estudo foi ter uma biópsia recente. Além disso, como esse trabalho refere-se a um estudo transversal não podemos determinar a sequência temporal exata dos eventos.

Embora esse estudo apresente certas limitações, os resultados obtidos fornecem evidências de que a genotipagem de polimorfismos no hospedeiro pode ser uma escolha para a detecção precoce de esteatose no futuro, e que as características do hospedeiro e do vírus podem ser investigadas em conjunto. Ainda, esses resultados fornecem informações úteis para identificar parte dos mecanismos subjacentes à esteatose hepática em pacientes cronicamente infectados pelo HCV. Até onde sabemos, existem poucos dados sobre esse assunto na literatura atual, pois poucos estudos avaliaram a relação entre essas três variantes genéticas no gene MTTP em conjunto com características virais e do hospedeiro em uma amostra de pacientes com hepatite C crônica.

6. CONCLUSÕES

- Foi detectada a presença de todos os genótipos dos três polimorfismos estudados no gene MTTP em pacientes com hepatite C crônica atendidos no HCFMUSP.
- O genótipo do SNP -164T/C no gene MTTP mais prevalente foi o homozigoto selvagem, seguido do heterozigoto e do homozigoto mutado nos pacientes com hepatite C crônica.
- O genótipo do SNP -400A/T no gene MTTP mais prevalente foi o heterozigoto, seguido do homozigoto selvagem e do homozigoto mutado nos pacientes com hepatite C crônica.
- O genótipo do SNP H297Q no gene MTTP mais prevalente foi o heterozigoto, seguido do homozigoto selvagem e do homozigoto mutado nos pacientes com hepatite C crônica.
- Os SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP, não foram associados com alterações nos níveis de lipídeos plasmáticos nos pacientes com hepatite C crônica.
- Os SNPs -164T/C, -400A/T e H297Q no gene MTTP, não apresentaram associação significativa com os diferentes graus de esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica.
- Os SNPs -164T/C e -400A/T no gene MTTP em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 foram associados com a esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica.
- O SNP -164T/C no gene MTTP em conjunto com nível elevado de GGT foi associado com a esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica.

- O SNP H297Q no gene MTTP não foi associado com a esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica mesmo quando analisado em conjunto com outras características do hospedeiro.

7. ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO..... Nº.....APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP:TELEFONE: (.....).....

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 DA PESQUISA

Título da Pesquisa - Alterações genéticas no gene MTTP e sua relação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica

Pesquisador Principal - Mariana Cavalheiro Magri

Cargo/função: Pesquisador Científico

Inscrição no Conselho Regional de Biologia nº: 040657101

Departamento/Instituto - Laboratório de Hepatologia por Vírus (LIM-47) do HCFMUSP

Convite à participação - Convidamos o (a) Sra. para participar desta pesquisa, sua colaboração é muito importante, pois conhecendo certas características genéticas do paciente com hepatite C crônica, poderemos planejar um tratamento que tenha maiores chances de sucesso.

Justificativa e objetivo do estudo - 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.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados - Para alcançar o objetivo desta pesquisa, vamos estudar algumas características genéticas dos pacientes com hepatite C crônica. Este estudo será realizado no sangue.

Para participar da pesquisa anterior “Manifestações extra-hepáticas da hepatite C - estudo transversal”, 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, por tanto, não será realizada nova coleta de material biológico para o presente estudo.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa - Não haverá nenhum desconforto ou risco, pois não haverá nenhum procedimento novo.

Benefícios esperados para o participante - Conhecendo certas características genéticas do paciente com hepatite C crônica, poderemos planejar um 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. O (a) senhor (a) terá acesso às informações sobre os resultados da pesquisa que sejam do conhecimento dos pesquisadores. No momento, não há benefício direto para os participantes.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa - Em qualquer etapa da pesquisa, com duração de 36 meses, o (a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer penalidade ou prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste Serviço.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. O (a) senhor (a) terá seu sigilo e privacidade garantidos.

Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento - É garantido que o participante desta pesquisa receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual será rubricado pelo pesquisador e o participante.

Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa - Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Dra. Mariana Cavalheiro Magri que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470, sala 106, Cerqueira César. Telefone: 3061-8124, e-mail mariana.magri@hc.fm.usp.br. 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 – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “**Alterações genéticas no gene MTTP e sua relação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica**”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Mariana Cavalheiro Magri) ou pessoa (s) por ela delegada (s) (Thamiris Vaz Gago Prata) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/representante legal

Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____

Anexo B - Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Alterações genéticas no gene MTTP e sua relação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica		
Pesquisador: Mariana Cavalheiro Magri		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 57626816.3.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.645.384		
Apresentação do Projeto:		
<p>A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é reconhecida como a maior causa de doença hepática crônica no mundo (Shepard, 2005). O HCV possui distribuição mundial e infecta 2,35% das pessoas no mundo (160 milhões de pessoas) (Lavanchy, 2011), e a estimativa de prevalência no Brasil é de 1,38% da população (Pereira et al., 2013). A infecção pelo HCV passa a ser considerada crônica após seis meses de persistência do RNA do HCV no sangue do paciente, e cerca de 80% dos casos de hepatite C aguda progredem para infecção crônica. As taxas de progressão da fibrose são extremamente variáveis e podem ser influenciadas pelo hospedeiro (idade, sexo, índice de massa corporal, resistência à insulina e diabetes), por fatores virais (genótipo, duração da infecção) e fatores ambientais (ingestão de álcool, tabagismo, coinfeção por outro vírus, imunossupressão) (Westbrook et al., 2014, Seeff, 2015). Uma comorbidade importante do hospedeiro é a esteatose hepática, presente em cerca de 40% dos pacientes com hepatite C crônica, sendo mais frequente e grave em pacientes com genótipo 3. A esteatose hepática é uma lesão histológica (caracterizada por um acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos) presente tanto na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) como na hepatite C crônica e vem sendo associada à progressão da fibrose hepática (Negro, 2010, Westbrook et al., 2014). Do ponto de vista geral o HCV parece interferir no metabolismo lipídico de três maneiras: prejudicando a</p>		
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 SP andar Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br		
1º		
Página 01 de 06		

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adinolfi LE, Restivo L, Marrone A. The predictive value of steatosis in hepatitis C virus infection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;7(3):205-13.

Adinolfi LE, Rinaldi L, Guerrera B, Restivo L, Marrone A, Giordano M, Zampino R. NAFLD and NASH in HCV infection: prevalence and significance in hepatic and extrahepatic manifestations. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):1-12.

Aminoff A, Ledmyr H, Thulin P, Lundell K, Nunez L, Strandhagen E, Murphy C, Lidberg U, Westerbacka J, Franco-Cereceda A, Liska J, Nielsen LB, Gåfvels M, Mannila MN, Hamsten A, Yki-Järvinen H, Thelle D, Eriksson P, Borén J, Ehrenborg E. Allele-specific regulation of MTTP expression influences the risk of ischemic heart disease. *J Lipid Res*. 2010;51(1):103-11.

Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9633-52.

Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut*. 2006;55:123-30.

Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. *World J Hepatol*. 2017;9(16):715-32.

Bernard S, Touzet S, Personne I, Lapras V, Bondon PJ, Berthezène F, Moulin P. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 2000;43:995-9.

Berthier MT, Houde A, Paradis AM, Couture P, Gaudet D, Després JP, Vohl MC. Molecular screening of the microsomal triglyceride transfer protein: association between polymorphisms and both abdominal obesity and plasma apolipoprotein B concentration. *J Hum Genet*. 2004;49(12):684-90.

Böhme M, Grallert H, Fischer A, Gieger C, Nitz I, Heid I, Kohl C, Wichmann HE, Illig T, Döring F, KORA Study Cohort. MTTP variants and body mass index, waist circumference and serum cholesterol level: association analyses in 7582 participants of the KORA study cohort. *Mol Genet Metab*. 2008;95(4):229-32.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais*. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2018.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções*. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2018.

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

Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29(S1):9-14.

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.

di Giuseppe R, Pechlivanis S, Fisher E, Arregui M, Weikert B, Knüppel S, Buijsse B, Fritsche A, Willich SN, Joost HG, Boeing H, Moebus S, Weikert C. Microsomal triglyceride transfer protein -164 T>C gene polymorphism and risk of cardiovascular disease: results from the EPIC-Potsdam case-cohort study. *BMC Med Genet*. 2013;14(19):1-9.

Duggal P, Thio CL, Wojcik GL, Goedert JJ, Mangia A, Latanich R, Kim AY, Lauer GM, Chung RT, Peters MG, Kirk GD, Mehta SH, Cox AL, Khakoo SI, Alric L, Cramp ME, Donfield SM, Edlin BR, Tobler LH, Busch MP, Alexander G, Rosen HR, Gao X, Abdel-Hamid M, Apps R, Carrington M, Thomas DL. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: data from multiple cohorts. *Ann Intern Med*. 2013;158(4):235-45.

Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, Sebastiani G, Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Stal P, Wong VWS, Kechagias S, Hultcrantz R, Loomba R. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-65.

Eslam M, Aparcero R, Kawaguchi T, Del Campo JA, Sata M, Khattab MA, Romero-Gomez M. Meta-analysis: insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):297-305.

Gambino R, Cassader M, Pagano G, Durazzo M, Musso G. Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein: a link between liver disease and atherogenic postprandial lipid profile in NASH? *Hepatology.* 2007;45(5):1097-107.

Gonzalez-Becerra K, Ramos-Lopez O, Garcia-Cazarin ML, Barron-Cabrera E, Panduro A, Martinez-Lopez E. Associations of the lipid genetic variants Thr54 (FABP2) and -493T (MTTP) with total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels in Mexican subjects. *J Int Med Res.* 2018;46(4):1467-76.

Goulart AC, Oliveira IR, Alencar AP, Santos MS, Santos IS, Martines BM, Meireles DP, Martines JA, Misciagna G, Benseñor IM, Lotufo PA. Diagnostic accuracy of a noninvasive hepatic ultrasound score for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). *Sao Paulo Med J.* 2015;133(2):115-24.

Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S45-57.

Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10:553-62.

Hashemi M, Hoseini H, Yaghmaei P, Moazeni-Roodi A, Bahari A, Hashemzahi N, Shafieipour S. Association of polymorphisms in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit and microsomal triglyceride transfer protein genes with nonalcoholic fatty liver disease. *DNA Cell Biol.* 2011;30(8):569-75.

Herrmann SM, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Arveiler D, Bao-Sheng C, Cambien F. Identification of two polymorphisms in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) gene: lack of association with lipoprotein profiles. *J Lipid Res.* 1998;39:2432-5.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression.* 2nd ed. New York: Wiley; 2000.

Hsiao PJ, Lee MY, Wang YT, Jiang HJ, Lin PC, Yang YH, Kuo KK. MTTP-297H polymorphism reduced serum cholesterol but increased risk of nonalcoholic fatty liver disease-a cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2015;16(93):1-10.

Hwang SJ, Luo JC, Chu CW, Lai CR, Lu CL, Tsay SH, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C virus infection: prevalence and clinical correlation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(2):190-5.

Irimia E, Mogoantă L, Predescu IO, Efrem IC, Stănescu C, Streba LA, Georgescu AM. Liver steatosis associated with chronic hepatitis C. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(2):351-6.

Jiménez-Sousa MA, Berenguer J, Fernández-Rodríguez A, Micheloud D, Guzmán-Fulgencio M, Miralles P, Pineda-Tenor D, García-Álvarez M, López JC, Aldámiz-Echevarria T, Carrero A, Resino S. IL28RA polymorphism (rs10903035) is associated with insulin resistance in HIV/HCV-coinfected patients. *J Viral Hepat*. 2014;21(3):189-97.

Karpe F, Lundahl B, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:756-61.

Kawaguchi T, Koga H, Torimura T. Recent advances in the pathogenesis of hepatitis C virus-related non-alcoholic fatty liver disease and its impact on patients cured of hepatitis C. *Curr Hepatology Rep*. 2017;16(4):317-25.

Khan AN, Said K, Ali K, Gul R. Frequency and severity of steatosis in patients with chronic hepatitis-c. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2015;27(1):105-7.

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

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, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.

Lancellotti S, Di Leo E, Penacchioni JY, Balli F, Viola L, Bertolini S, Calandra S, Tarugi P. Hypobetalipoproteinemia with an apparently recessive inheritance due

to a “de novo” mutation of apolipoprotein B. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1688(1):61-7.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):107-15.

Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, Adinolfi LE, Asselah T, Jonsson JR, Smedile A, Terrault N, Pazienza V, Giordani MT, Giostra E, Sonzogni A, Ruggiero G, Marcellin P, Powell EE, George J, Negro F; HCV Meta-Analysis (on) Individual Patients' Data Study Group. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1636-42.

Lebray P, Zylberberg H, Hue S, Poulet B, Carnot F, Martin S, Chretien Y, Pol S, Caillat-Zuckman S, Bréchet C, Nalpas B. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):175-82.

Ledmyr H, Karpe F, Lundahl B, McKinnon M, Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E. Variants of the microsomal triglyceride transfer protein gene are associated with plasma cholesterol levels and body mass index. *J Lipid Res*. 2002;43:51-8.

Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9270-80.

Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol*. 2015;7(10):1377-89.

Li L, Wang SJ, Shi K, Chen D, Jia H, Zhu J. Correlation between MTP -493G>T polymorphism and non-alcoholic fatty liver disease risk: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res*. 2014;13(4):10150-61.

Magri MC, Prata TVG, Manchiero C, Dantas BP, Mazza CC, Tengan FM. Genetic variation in the microsomal triglyceride transfer protein (-493G/T) is associated with hepatic steatosis in patients infected with hepatitis C virus. *BMC Infect Dis*. 2017;17(235):1-10.

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.

Mirandola S, Bowman D, Hussain MH, Alberti A. Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7(13):1-9.

Mirandola S, Osterreicher CH, Marcolongo M, Datz C, Aigner E, Schlabrakowski A, Realdon S, Gerotto M, Alberti A, Stickel F. Microsomal triglyceride transfer protein polymorphism (-493G/T) is associated with hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29(4):557-65.

Miyaaki H, Nakao K. Significance of genetic polymorphisms in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin J Gastroenterol*. 2017;10:201-7.

Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, Martinot-Peignoux M, Maylin S, Nicolas-Chanoine MH, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):416-23.

Mukherjee R, Burns A, Rodden D, Chang F, Chaum M, Garcia N, Bollipalli N, Niemz A. Diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Lab Autom*. 2015;20(5):519-38.

Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Tremblay CL. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):967-72.

Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hiroi M, Enzan H, Onishi S. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2004;40(5):781-6.

Negro F. Facts and fictions of HCV and comorbidities: steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S69-78.

Negro F. Hepatitis C virus-induced steatosis: an overview. *Dig Dis*. 2010;28(1):294-9.

Nirei K, Matsumura H, Kumakawa M, Matsumoto N, Nakamura H, Yamagami H, Matsuoka S, Moriyama M. Steatosis influences the clinical profiles and long-term outcomes of interferon-treated chronic hepatitis C and liver cirrhosis patients. *Int J Med Sci*. 2017;14(1):45-52.

Okumura K, Imamura A, Murakami R, Takahashi R, Cheng XW, Numaguchi Y, Murohara T. Microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism strongly influences circulating malondialdehyde-modified low-density lipoprotein. *Metabolism*. 2009;58(9):1306-11.

Oliveira LP, Jesus RP, Boulhosa RS, Mendes CM, Lyra AC, Lyra LG. Metabolic syndrome in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection who do not have obesity or type 2 diabetes. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(3):219-23.

Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. *Gastroenterology*. 2016;151(1):70-86.

Peng XE, Wu YL, Lu QQ, Hu ZJ, Lin X. MTP polymorphisms and susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease in a Han Chinese population. *Liver Int*. 2014;34(1):118-28.

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 Infect Dis*. 2013;13(60):1-12.

Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chrétien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Bréchet C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J*. 2002;16(2):185-94.

Petit JM, Masson D, Minello A, Duvillard L, Galland F, Verges B, Gamber P, Hillon P. Lack of association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and liver steatosis in HCV-infected patients. *Mol Genet Metab*. 2006;88(2):196-8.

Petta S, Rosso C, Leung R, Abate ML, Booth D, Salomone F, Gambino R, Rizzetto M, Caviglia P, Smedile A, Grimaudo S, Cammà C, Craxi A, George J, Bugianesi E. Effects of IL28B rs12979860 CC genotype on metabolic profile

and sustained virologic response in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(3):311-7.

Phillips C, Mullan K, Owens D, Tomkin GH. Microsomal triglyceride transfer protein polymorphisms and lipoprotein levels in type 2 diabetes. *QJM*. 2004;97(4):211-8.

Reccia I, Kumar J, Akladios C, Viridis F, Pai M, Habib N, Spalding D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism*. 2017;72:94-108.

Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, Leandro G, Male PJ, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut*. 2004;53(3):406-12.

Rubin D, Helwig U, Pfeuffer M, Schreiber S, Boeing H, Fisher E, Pfeiffer A, Freitag-Wolf S, Foelsch UR, Doering F, Schrezenmeir J. A common functional exon polymorphism in the microsomal triglyceride transfer protein gene is associated with type 2 diabetes, impaired glucose metabolism and insulin levels. *J Hum Genet*. 2006;51(6):567-74.

Rubin D, Schneider-Muntau A, Klapper M, Nitz I, Helwig U, Fölsch UR, Schrezenmeir J, Döring F. Functional analysis of promoter variants in the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene. *Hum Mutat*. 2008;29(1):123-29.

Rudnicka A, Woziwodzka A, Wróblewska A, Rybicka M, Bielawski KP, Sikorska K, Bernat A. Analysis of polymorphism and hepatic expression of duodenal cytochrome b in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(2):482-6.

Saad Y, Shaker O, Nassar Y, Ahmad L, Said M, Esmat G. A polymorphism in the microsomal triglyceride transfer protein can predict the response to antiviral therapy in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus genotype 4 infection. *Gut Liver*. 2014;8(6):655-61.

Scheel TKH, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013;19(7):837-49.

Seeff LB. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int*. 2009;29(S1):89-99.

Shiffman ML, Benhamou Y. Cure of HCV related liver disease. *Liver Int.* 2015;35(1):71-7.

Silva IS, Ferraz ML, Perez RM, Lanzoni VP, Figueiredo VM, Silva AE. Role of gamma-glutamyl transferase activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19(3):314-8.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318-27.

Stevenson HL, Uday NS. Hepatic steatosis in HCV-infected persons in the direct-acting antiviral era. *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 2016;2(21):1-7.

Talmud PJ, Palmen J, Miller G, Humphries SE. Effect of microsomal triglyceride transfer protein gene variants (-493G>T, Q95H and H297Q) on plasma lipid levels in healthy middle-aged UK men. *Ann Hum Genet.* 2000;64(Pt 4):269-76.

The French METAVIR Cooperative Study Group. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1994;20(1):15-20.

Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology.* 2008;48(2):418-31.

Valenti L, Pulixi EA, Arosio P, Cremonesi L, Biasiotto G, Dongiovanni P, Maggioni M, Fargion S, Fracanzani AL. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica.* 2007;92(8):1037-42.

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.

Villar LM, Caldas GC, Scalioni LP, Miguel JC, Silva EFD, Marques VA, Villela-Nogueira CA, Lewis-Ximenez LL, Lampe E. High prevalence of insulin resistance among Brazilian chronic hepatitis C patients. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61(6):628-32.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S58-68.

Wetterau JR, Zilversmit DB. A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J Biol Chem.* 1984;259(17):10863-6.

World Health Organization. *Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis c virus infection.* Geneva: WHO; 2018.

Yang ZT, Zhang XX, Kong XF, Zhang DH, Zhang SY, Jiang JH, Gong QM, Jin GD, Lu ZM. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein in different hepatitis B virus-infected patients. *World J Gastroenterol.* 2008;14(35):5454-60.

Zampino R, Ingrosso D, Durante-Mangoni E, Capasso R, Tripodi MF, Restivo L, Zappia V, Ruggiero G, Adinolfi LE. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) –493G/T gene polymorphism contributes to fat liver accumulation in HCV genotype 3 infected patients. *J Viral Hepat.* 2008;15(10):740-6.

Zheng W, Wang L, Su X, Hu XF. MTP -493G>T polymorphism and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 2014;33(6):361-9.

Zheng YY, Wang LF, Fan XH, Wu CH, Huo N, Lu HY, Xu XY, Wei L. Association of suppressor of cytokine signalling 3 polymorphisms with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2013;20(4):273-80.