LUCIANO BELTRÃO PEREIRA

Influência dos polimorfismos de genes da NADPH oxidase na fibrose hepática e sua correlação com a síndrome metabólica nos portadores de vírus da hepatite C

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Luciano Beltrão
Influência dos polimorfismos de genes da NADPH oxidase na fibrose hepática e sua correlação com a síndrome metabólica nos portadores de vírus da hepatite C / Luciano Beltrão Pereira. -- São Paulo, 2015.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Hepatite C 2.NADPH oxidase 3.Cirrose hepática 4.Síndrome X metabólica 5.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-380/15

Dedicatória

Leila, minha mãe, minha melhor amiga,

exemplo de amor e cuidado em minha vida.

Carlos, meu pai, meu amigo,

exemplo de pessoa boa e “unique”.

Carla, minha irmã mais que amada.

Meus avós, exemplos maiores de toda a família.

À minha grande família, minha força maior,

meu apoio constante, meu alicerce.

Ao sentimento invisível que sempre me apoiou

e é essencial em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por terem me proporcionado condições para chegar até aqui e a toda a minha família, amigos e todos que me apoiaram.

À minha orientadora, Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, pelos inúmeros ensinamentos, disponibilidade, paciência, compreensão e parceria.

Aos professores titulares e chefes de departamento da USP, Prof. Dr. Flair José Carrilho e Prof. Dr. Luiz Carneiro D'Albuquerque, pela oportunidade e apoio à pesquisa.

Ao Dr. José Tadeu Stefano, exemplo de pesquisador, pelo grande auxílio em realizar todo esse trabalho.

A todos os membros do LIM-7 e da Gastroenterologia do HC-FMUSP por toda ajuda e apoio durante todo o processo, desde o início.

A todos do LIM-25 e da Endocrinologia do HC-FMUSP em nome da Dra. Maria Lucia Corrêa-Giannela, cuja colaboração foi essencial na pesquisa e elaboração da tese e artigo.

À Vilma Libério, secretária da pós-graduação em Ciências em Gastroenterologia da FMUSP, por toda dedicação e empenho para me ajudar durante todas as etapas da pós-graduação. Em nome dela agradeço a todos os colaboradores do setor.

Ao Dr. Ivan Pontes Beltrão pela seriedade e exemplo de profissional médico ético e ser humano com caráter ímpar.

À Profa. Dra. Leila Maria Moreira Beltrão Pereira, Professora Titular de Gastroenterologia da Universidade de Pernambuco (UPE), pelo exemplo de uma vida toda, tanto familiar quanto profissionalmente e na pesquisa e medicina, por me ensinar e demonstrar a melhor forma possível em tudo.

À Dra. Erika Rabelo Forte de Siqueira, médica do Instituto do Fígado e Transplantes de Pernambuco (IFP), companheira de pós-graduação da USP, pela ajuda mútua em projetos concomitantes.

Ao Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos, pesquisador nato, pelo estímulo desde o tempo de aluno de graduação, pela ajuda no projeto e análise, em nome de quem agradeço todos os pesquisadores e equipe do IFP.

A todos os alunos de iniciação científica e de pós-graduação que me ajudaram direta e indiretamente, fazendo com que sempre houvesse uma melhora trocando pontos de vista, experiências e ajudas.

Agradeço as palavras de incentivo e amor. E a Deus por tornar tudo possível.

Epígrafe

“Só sei que nada sei.”

Sócrates

Normatização adotada

Essa 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, Símbolos e Siglas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 História natural da hepatite C e patogênese 3
1.2 Sistema NADPH oxidase 6
1.3 Sistema NADPH oxidase, EROS, fibrose hepática 7
1.4 Infecção pelo VHC e NADPH oxidases 8
1.5 Polimorfismos das NADPH oxidases 12
2 JUSTIFICATIVA 15
3 OBJETIVOS 17
4 MÉTODOS 19
4.1 Desenho do estudo 20
4.2 Critérios de inclusão 20
4.3 Critérios de exclusão 20
4.4 Avaliação clínica 21
4.6 Determinações bioquímicas 22
4.7 Polimorfismo no gene da NADPH oxidase 22
4.7.1 Extração do DNA genômico 23
4.7.2 Genotipagem dos polimorfismos –1435 C/A no gene NOX4 (rs3017887) e –675 T/A no gene CYBA 24
4.8 Aspectos éticos 25
4,9 Análise estatística 25
5 RESULTADOS 27
6 DISCUSSÃO 33
7 CONCLUSÕES 40
8 ANEXOS 42
9 REFERÊNCIAS 47

Listas

Abreviaturas, Símbolos e Siglas

ALT	alanina aminotransferase
Anti-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C
AST	aspartato aminotransferase
ATP III	*Adult Treatment Panel III*
cDNA	DNA complementar
CHC	carcinoma hepatocelular
CT	colesterol total
CYBA	citocromo b-245 alpha (subunidade regulatória p22phox)
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROS	espécies reativas de oxigénio
et al	e outros
F	feminino
FA	fosfatase alcalina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GGT	gama-glutamil transpeptidase
HDL	lipoproteína de alta densidade
HSCs	células estreladas hepáticas
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IC	intervalo de confiança
IFP	Instituto do Fígado e Transplantes de Pernambuco
IL-6	interleucina 6
IMC	índice de massa corporal
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LIM/07	Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental
LIM/25	Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular
M	masculino
MAF	frequência do menor alelo
mRNA	RNA mensageiro

MTP	proteína microssomal transportadora de triglicerídeos
NADPH	*nicotinamide adenine dinucleotide phospate*
NK	*natural killer*
NKT	células T invariantes *natural killer*
NOXs	NADPH oxidases
NOX4	NADPH oxidase 4
NOX4-ΔCT	NOX4 cDNA dominante negativo
NS3-NS5	proteínas não estruturais de VHC
O2	oxigênio
OR	razão de chances
P	valor-*p*
PCR	reação de polimerização em cadeia
PPAR α	receptor ativador do proliferador de peroxissoma alfa
RNA	ácido ribonucleico
RI	resistência insulínica
SM	síndrome metabólica
SNP	polimorfismo de um único nucleotídeo
SREBP-1	proteína ligante do elemento regulador de esteroides-1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TGF-β MAb	anticorpo específico para TGF-β
TGF-β RII-DN	forma inativa do TGF-β
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UPE	Universidade de Pernambuco
VHC	vírus da hepatite C

Figuras

Figura 1 - Alteração no metabolismo dos lipídios e acúmulo de gordura nos hepatócitos induzido pelo vírus da hepatite C 5

Figura 2 - Estrutura do complexo fagocítico NOX2 e do complexo não fagocítico NOX1..... 7

Figura 3 - Estresse oxidativo induzido pela NOX4 em resposta ao VHC é regulado pelo TGF-β. 11

Figura 4 - Modelo proposto de hepatócitos de proteínas NOX na patogênese induzida do VHC 11

Tabelas

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes segundo o grau de fibrose em pacientes com hepatite C crônica 29

Tabela 2 - Frequência genotípica de acordo com o grau de fibrose em pacientes do sexo masculino com hepatite C crônica 30

Tabela 3 - Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) em pacientes do sexo masculino com hepatite C crônica 31

Tabela 4 - Frequências genotípicas do polimorfismo de nucleotídeo único rs3017887 do *NOX4* relacionadas com a síndrome metabólica (SM) 32

Resumo

Pereira LB. *Influência dos polimorfismos de genes da NADPH oxidase na fibrose hepática e sua correlação com a síndrome metabólica nos portadores de vírus da hepatite C* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A infecção pelo vírus da hepatite C é a principal causa de doença hepática crônica que progride para cirrose e carcinoma hepatocelular. Diversos fatores relacionados ao vírus e ao hospedeiro determinam a progressão para formas mais graves de fibrose hepática. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) promovendo o estresse oxidativo contribui significativamente na fibrogênese hepática e pode ser gerada de múltiplas fontes, incluindo a cadeia respiratória mitocondrial, o citocromo p4502E1, peroxissomos e as NADPH oxidases (NOXs) no fígado. O sistema da NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phospate*) oxidase tem uma participação muito importante na geração de EROS induzidas pelo vírus da hepatite C (VHC). Por isso, no presente estudo, investigamos dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) na região reguladora dos genes codificadores da subunidade catalisadora da NADPH oxidase 4 (*NOX4*) e sua subunidade regulatória p22phox (*CYBA*) e a associação deles com variáveis metabólicas e histológicas em pacientes com VHC. MÉTODOS: Cento e setenta e oito pacientes portadores do VHC e virgens de tratamento (49,3% sexo masculino; 65% VHC genótipo 1) foram analisados. Todos os pacientes tinham VHC RNA positivo e foram genotipados para os SNPs rs3017887 na *NOX4* e −675 T → A na *CYBA* usando-se primer e probes específicos. RESULTADOS: Nenhuma associação foi vista entre as frequências genotípicas dos SNPs da *NOX4* e *CYBA* com marcadores de inflamação ou grau de fibrose hepática na população total estudada. A presença dos genótipos CA + AA do SNP da *NOX4* SNP teve associação com menor concentração sérica da alanino aminotransferase (ALT) na população masculina (CA + AA = 72,23 ± 6,34 U/L *versus* CC = 100,22 ± 9,85; média ± SEM; $P = 0,05$). O genótipo TT do SNP da *CYBA* teve associação com menor concentração sérica da ALT na população masculina (TT = 84,01 ± 6,77 U/L *versus* TA + AA = 109,67 ± 18,37 U/L; média ± SEM; $P = 0,047$). Por outro lado, o alelo menor do SNP da *NOX4* foi inversamente associado com a frequência de síndrome metabólica (SM) na população masculina (odds ratio (OR): 0,15; 95% intervalo de confiança (IC): 0,03 – 0,79; $P = 0,025$). CONCLUSÕES: Os resultados sugerem que os SNPs da *NOX4* e *CYBA* avaliados no estudo não são marcadores genéticos diretos de fibrose hepática em pacientes portadores do VHC, entretanto o SNP rs3017887 da *NOX4* poderia influir indiretamente na susceptibilidade da fibrose hepática devido a associação inversa com SM nos pacientes do sexo masculino.

Descritores: Hepatite C; NADPH oxidase; Cirrose hepática; Síndrome X metabólica; Polimorfismo genético

Abstract

Pereira LB. *Influence of polymorphisms of the NADPH oxidase 4 gene in liver fibrosis and metabolic syndrome correlation in patients with hepatitis C* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

BACKGROUND: The hepatitis C virus infection is the leading cause of chronic liver disease that progresses into cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Several factors related to the virus and the host determine the progression to more severe forms of liver fibrosis. The production of reactive oxygen species (ROS) promoting oxidative stress contribute significantly in liver fibrogenesis and can be generated from multiple sources, including mitochondrial respiratory chain, cytochrome p4502E1, peroxisomes and NADPH oxidases (NOXS) in the liver. Given the important contribution of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase system to the generation of reactive oxygen species induced by hepatitis C virus (HCV), we investigated in the present study, two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the putative regulatory region of the genes encoding NADPH oxidase 4 catalytic subunit (*NOX4*) and its regulatory subunit p22phox (*CYBA*) and their relation with metabolic and histological variables in patients with HCV. METHODS: One hundred seventy eight naïve HCV patients (49.3% male; 65% HCV genotype 1) with positive HCV RNA were genotyped using specific primers and fluorescent-labeled probes for SNPs rs3017887 in *NOX4* and −675 T → A in *CYBA*. RESULTS: No association was found between the genotype frequencies of *NOX4* and *CYBA* SNPs and inflammation scores or fibrosis stages in the overall population. The presence of the CA + AA genotypes of the *NOX4* SNP was nominally associated with a lower alaninoamine transferase (ALT) concentration in the male population (CA + AA = 72.23 ± 6.34U/L *versus* CC = 100.22 ± 9.85; mean ± SEM; $P = 0.05$). The TT genotype of the *CYBA* SNP was also nominally associated with a lower ALT concentration in the male population (TT = 84.01 ± 6.77U/L *versus* TA + AA = 109.67 ± 18.37U/L; mean ± SEM; $P = 0.047$). The minor A-allele of the *NOX4* SNP was inversely associated with the frequency of metabolic syndrome (MS) in the male population (odds ratio (OR): 0.15; 95% confidence interval (CI): 0.03 to 0.79; $P = 0.025$). CONCLUSIONS: The results suggest that the evaluated *NOX4* and *CYBA* SNPs are not direct genetic determinants of fibrosis in HCV patients, but nevertheless *NOX4* rs3017887 SNP could indirectly influence fibrosis susceptibility due to its inverse association with MS in male patients.

Descriptors: hepatitis C; NADPH oxidase; hepatic fibrosis; metabolic syndrome X; genetic polymorphism.

1 Introdução

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) atinge aproximadamente 180 milhões de pessoas e é responsável por cerca de 250.000 a 350.000 mortes por ano, em todo o mundo, relacionadas com descompensação da cirrose hepática, doença hepática em fase terminal e carcinoma hepatocelular [1]. Nos Estados Unidos, a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C foi de 1,6% entre os anos 1999 e 2002, equivalendo a cerca de 4,1 milhões de pessoas positivas para o anticorpo contra o vírus da hepatite C (Anti-HCV) [1]. No Brasil, segundo dados do inquérito nacional de hepatites virais de base populacional nas capitais brasileiras, a prevalência global para o anti-HCV referente ao conjunto das capitais federais foi de 1,38% (IC95% 1,12% - 1,64%) [2].

O VHC é um vírus RNA, da família *Flaviviridae* e do gênero *Hepacivirus.* O genoma do VHC é composto por genes estruturais (core, E1 e E2) e não estruturais (NS2-NS5B), que são dispostos na seguinte sequência: NH2-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH [2]. O VHC apresenta sete diferentes genótipos e uma variação de subtipos (1a, 1b, 1c etc.). Os genótipos 1, 2 e 4 são mais encontrados no centro-oeste da África e o subtipo 4a, no Egito; o genótipo 5 é frequente no sul da África, e os outros genótipos na China, sudeste da Ásia e na Índia [3]. No Brasil, os genótipos 1 e 3 são os mais frequentes [4].

Os principais fatores de risco relacionados à transmissão do VHC são hemotransfusão, transplante de órgãos sólidos de doadores infectados, uso de drogas ilícitas injetáveis e exposição ocupacional a sangue e derivados [5].

1.1 História natural da hepatite C e patogênese

O VHC é responsável por causar lesões inflamatórias no fígado, podendo estar associado a acúmulo de lipídios intra-hepáticos (esteatose) e a progressivos graus de fibrose. A longo prazo, pode desencadear cirrose hepática e carcinoma hepatocelular [6,7]. Na evolução da hepatite C, 60% a 80% dos casos progridem para forma crônica e mais de 20% progridem para cirrose hepática. A forma aguda da infecção tem resolução espontânea em mais de 45% dos casos [8].

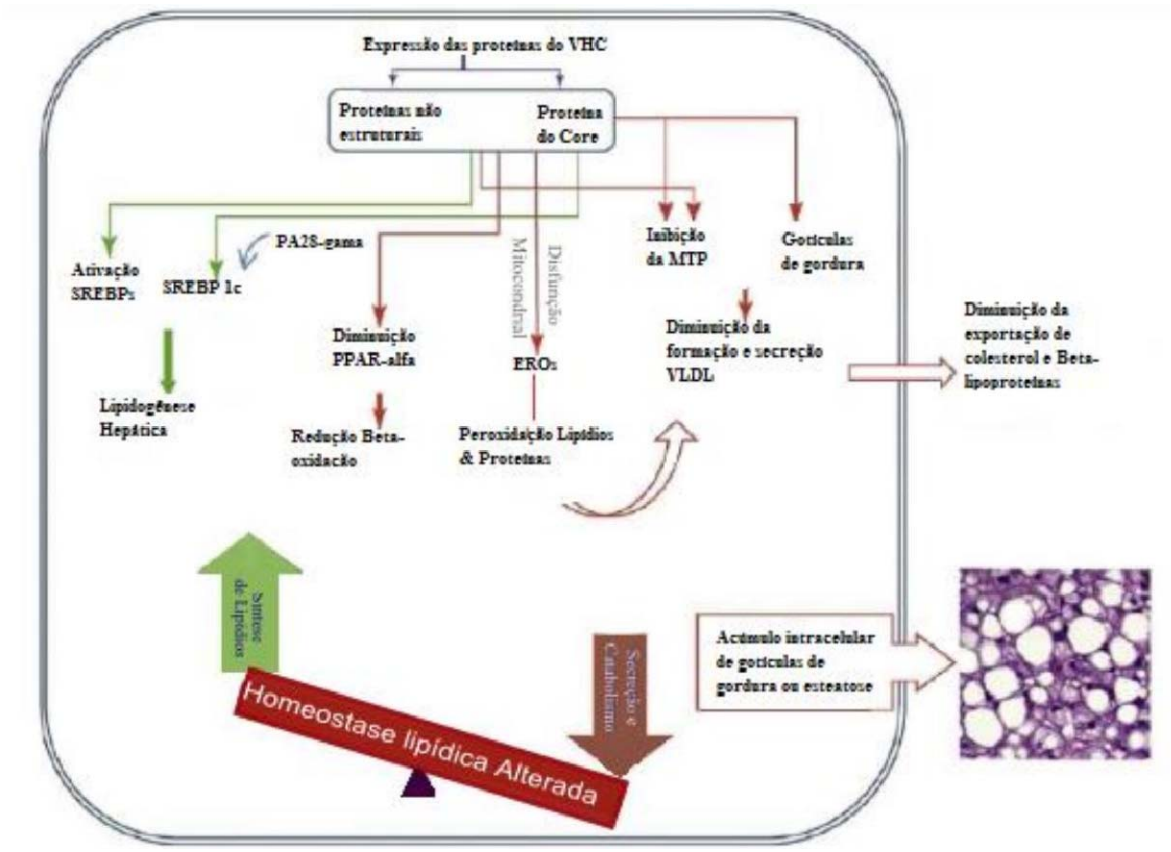
O processo de fibrogênese hepática é um processo dinâmico e caracterizado pela síntese de componentes da matriz extracelular, uma mistura complexa de glicoproteínas (colágeno, elastina, fibronectina, laminina) e proteoglicanos [9]. Os estímulos podem incluir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), com subsequente desenvolvimento de estresse oxidativo, hipóxia, inflamação, resposta imune, apoptose, esteatose e alterações na matriz extracelular [10]. Na hepatite C crônica, observa-se, inicialmente, fibrose na área periportal ou fibrose zona 1 que, gradualmente, estende-se para as veias centrais ou fibrose zona 3. O estágio final se constitui em extensa fibrose com formação de pontes, septos

e nódulos entre a área periportal e central, caracterizando a cirrose hepática [11,12,13].

O VHC pode estimular diretamente a fibrogênese por meio de interações entre os hepatócitos infectados, proteínas virais e as células estreladas hepáticas (HSCs). Esta evidência foi demonstrada pela primeira vez em experimentos envolvendo HSCs de humanos e de ratos, nos quais se demonstrou aumento da concentração de cálcio intracelular e da produção de EROS [14]. A infecção de HSCs com proteínas não estruturais de VHC (NS3-NS5) conduziu a um aumento acentuado do fator de crescimento transformador-β (TGF-β), que é uma citocina fibrogênica clássica, sendo o estímulo mais potente para a produção do colágeno tipo I e as HSCs sendo a fonte mais importante de TGF-β1 na fibrose hepática [15]. Associado a isso, a resistência insulínica (RI) tem um importante papel na fibrogênese hepática. A hiperinsulinemia pode estimular diretamente HSCs a produzir e secretar matriz extracelular e, posteriormente, níveis elevados de glicose e insulina ativam o fator de crescimento do tecido conjuntivo, estimulando a fibrogênese hepática [16,17,18].

Por outro lado, sabe-se que as proteínas estruturais e não estruturais do VHC induzem a alteração no metabolismo dos lipídios e o acúmulo de gordura nos hepatócitos através da ativação de genes da proteína ligante do elemento regulador de esteroides-1 (SREBP-1). Além disso, o VHC reduz a taxa de excreção hepática de lipídios, por meio de disfunção mitocondrial e da inibição da proteína microssomal transportadora de triglicerídeos (MTP) [19], assim como reduz a beta-oxidação, por inibir o receptor ativador do

proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α) (Figura 1) [20]. A RI, por sua vez, seria o produto da expressão aumentada da infecção crônica pelo VHC induzida por citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6 [21]. Todos estes fenômenos inflamatórios, de morte celular e de fibrogênese hepática ocorrem simultaneamente e o estresse oxidativo com a produção excessiva de EROS é um dos principais mecanismos de fibrogênese na hepatite C.



Fonte: Adaptado de Syed et al. [20], p. 35.

Figura 1 - Alteração no metabolismo dos lipídios e acúmulo de gordura nos hepatócitos induzido pelo vírus da hepatite C

1.2 Sistema NADPH oxidase

As NADPH oxidases, ou NOX, são proteínas que transferem elétrons através de membranas e catalizam a redução dependente de NADPH de O2 a $O2^{-}$, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS participam diretamente da defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus, protozoários e fungos. A NOX clássica é a NOX fagocítica encontrada em neutrófilos. O complexo NOX fagocítico consiste na subunidade catalítica $gp91^{phox}$, renomeada NOX2, junto com a subunidade regulatória $p22^{phox}$ localizada na membrana. Os outros componentes regulatórios $p47^{phox}$, $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ e a pequena GTPase Rac estão normalmente localizados no citoplasma [22]. Com a estimulação por agonistas, as subunidades citosólicas translocam para o complexo citocrômico ligado à membrana levando à atividade enzimática. Os humanos têm quatro proteínas homólogas adicionais (NOX1, NOX3, NOX4 e NOX5) e duas enzimas relacionadas (DUOX1 e DUOX2) que podem funcionar em não fagócitos [22]. Entre os sete membros da família NOX, a NOX1 é estrutural e funcionalmente similar à NOX2. Enquanto a NOX1 é também $p22^{phox}$-dependente, a NOX 1 pode usar a NOXO1 (homóloga da $p47^{phox}$) para organizar a montagem (*assembly*) das enzimas e a NOXA1 (homóloga da $p67^{phox}$) para a ativação enzimática [23]. Em contraste, a NOX4 requer apenas a $p22^{phox}$ sem o recrutamento dos componentes regulatórios citosólicos para exercer sua atividade enzimática. Todas as enzimas NOX são capazes de catalizar a redução do oxigênio molecular para superóxido, mas elas apresentam diferenças chave nas suas ativações, composições de

subunidade, localizações e expressões [24]. A Figura 2 exemplifica o complexo fagocítico NOX2 e o complexo não fagocítico NOX1.

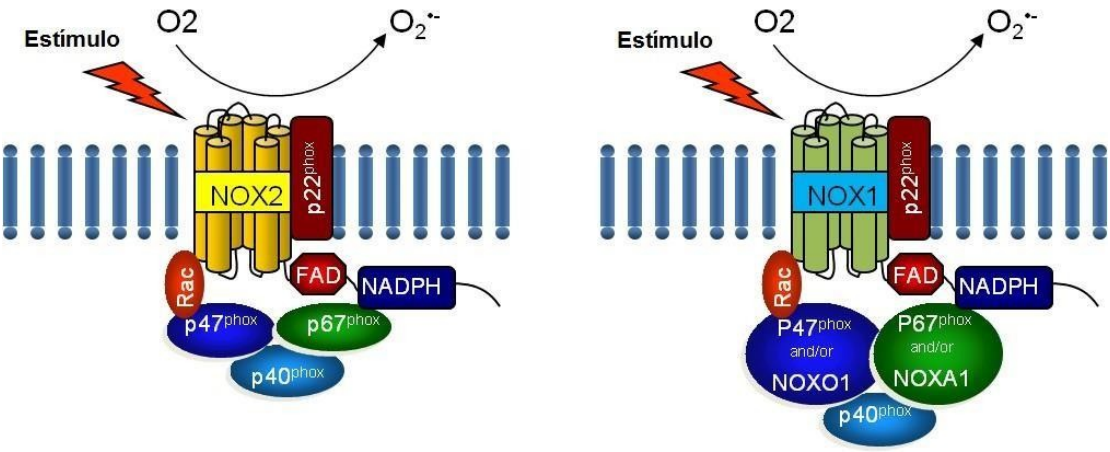


Figura 2 - Estrutura do complexo fagocítico NOX2 e do complexo não fagocítico NOX1. (Adaptado de Paik et al. [25])

1.3 Sistema NADPH oxidase, EROS, fibrose hepática

As EROS contribuem significativamente na fibrogênese hepática a partir de várias lesões ao fígado, incluindo abuso de álcool, infecção pelo vírus da hepatite C, sobrecarga de ferro e colestase crônica. As EROS podem ser geradas de múltiplas fontes, incluindo a cadeia respiratória mitocondrial, o citocromo p4502E1, peroxissomos e as NADPH oxidases (NOXs) no fígado [23]. No fígado, a NOX é expressa funcionalmente tanto na forma fagocítica como não fagocítica. Estudos experimentais demonstram que os componentes da NOX fagocítica como a NOX2, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ são principalmente expressos nas células de Kupffer, enquanto os

componentes não fagocíticos incluindo NOX1, NOXO1 e NOXA1 são expressos nas HSCs e células endoteliais [25].

A NOX4 tem uma sequência de aminoácidos 39% idêntica à NOX2 e, embora descrita originalmente nos rins, o RNA mensageiro (mRNA) da NOX4 é detectado em diversos outros tecidos humanos e murinos, incluindo ossos, tecido vascular e pulmões [22,26]. No tecido hepático normal, o mRNA da NOX4 é detectado em baixos níveis em comparação com a quantidade nos rins e, embora seja uma enzima geradora de EROS constitutivamente ativa, tem expressão aumentada de mRNA, proteína e EROS em resposta a estímulos inflamatórios. Trabalhos mostram que EROS derivadas da NOX4 estão envolvidas nas vias de fibrose induzida por TGF-β (fator de crescimento transformador-β), estresse do retículo endoplasmático, transcrição regulada por interferon beta e vias mediadas por receptores *Toll-like* tipo 4 [27,28].

Com base em diversos estudos em modelos experimentais de ratos e camundongos e de HSCs e doença hepática crônica, sabe-se que o estresse oxidativo leva a dano hepatocitário e ativação de HSCs, resultando em fibrose hepática, sendo o TGF-β necessário neste processo [29].

1.4 Infecção pelo VHC e NADPH oxidases

O VHC induz múltiplas respostas imunes, e diversas linhas de evidência sugerem que linfócitos citotóxicos apresentam um papel na erradicação da infecção aguda e no controle da infecção crônica [30].

Publicações na literatura médica evidenciam que proteínas do VHC, como a proteína não estrutural 3 (NS3) e a NS5A, são capazes de estimular a formação de radicais de oxigênio no tecido infectado, via ativação de NADPH oxidases (no caso da NS3) [31,32]. Além disso, há trabalhos relatando que a NS3 desencadeou disfunção e apoptose de três principais subtipos de linfócitos citotóxicos que são prevalentemente encontrados em tecido hepático cronicamente infectado pelo VHC: linfócitos T convencionais (com fenótipo $CD3^+/56^-$), células NK (natural killer – $CD3^-/56^+$) e células NKT ($CD3^+/56^+$). Esta disfunção e apoptose resultaram de uma liberação de EROS dos fagócitos induzida pela NS3, com papel importante da NADPH oxidase [33]. Este mecanismo poderia explicar um dos motivos pelos quais o VHC pode evadir o sistema imune, possibilitando a persistência viral e contribuindo para a cronicidade da doença. De fato, as EROS têm um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença hepática inflamatória mediada pelo VHC. Este vírus induz uma produção maior de EROS do que outros vírus de hepatite [34,35]. Estes dados podem sugerir que enzimas geradoras de EROS, como as NADPH oxidases, estão envolvidas na progressão da doença inflamatória hepática [36].

Os níveis elevados de ferro durante a infecção viral perpetuam um ciclo vicioso de mais estresse oxidativo. O ferro catalisa a geração de radicais hidroxila altamente reativos, além de favorecer a decomposição de peróxidos lipídicos. A constante liberação de oxigênio mutagênico e potencialmente carcinogênico pode aumentar o risco de carcinoma hepatocelular e hepatite C crônica [37,38,39]. O peptídeo C5A do VHC pode

funcionar como um quimiotáxico e ativador de leucócitos fagocíticos humanos, levando a uma infiltração intensa de fagócitos. Desta forma, a NOX2 das células do sistema imune provavelmente podem ser uma fonte importante de EROS durante a infecção pelo VHC [40,41].

Em meados desta década, foi demonstrada em hepatócitos humanos e murinos a modulação do NOX4 pelo VHC, sugerindo um papel do estresse oxidativo dependente da NOX4 na doença hepática induzida pelo VHC [42]. Foi também possível demonstrar que a expressão de NOX4 e a produção de EROS são reguladas pela proteína *core* do VHC via sinalização autócrina TGF-alfa dependente. Desta maneira, os autores concluem que a NOX4, como uma reguladora de lesão oxidativa sustentada através de um mecanismo TGF-alfa dependente, seria uma importante candidata na progressão da doença hepática inflamatória pelo VHC, conforme exemplificado nas Figuras 3 e 4 [42].

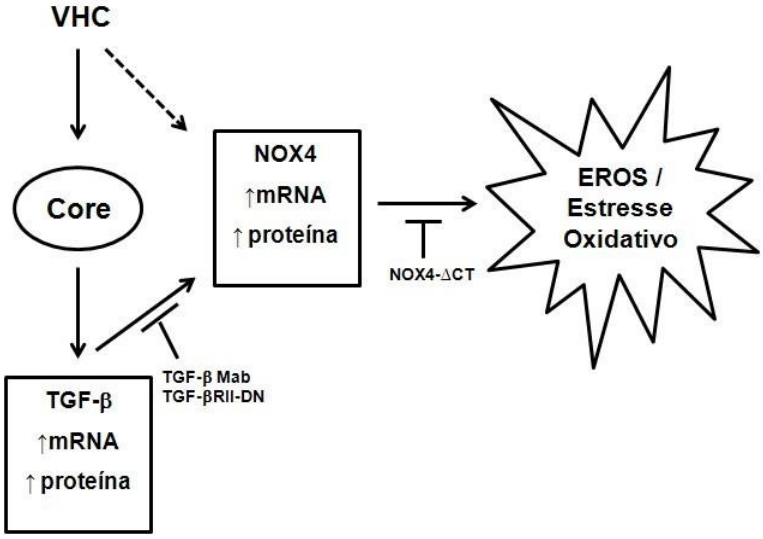


Figura 3 - Estresse oxidativo induzido pela NOX4 em resposta ao VHC é regulado pelo TGF-β. (Adaptado de Boudreau et al. [42]).

Abreviaturas: VHC: vírus da hepatite C; TGF-β: fator de crescimento transformador-β; mRNA: RNA mensageiro; TGF-β MAb: anticorpo específico para TGF-β; TGF-β RII-DN: forma inativa do TGF-β; NOX4-ΔCT: NOX4 cDNA dominante negativo; EROS: espécies reativas de oxigênio

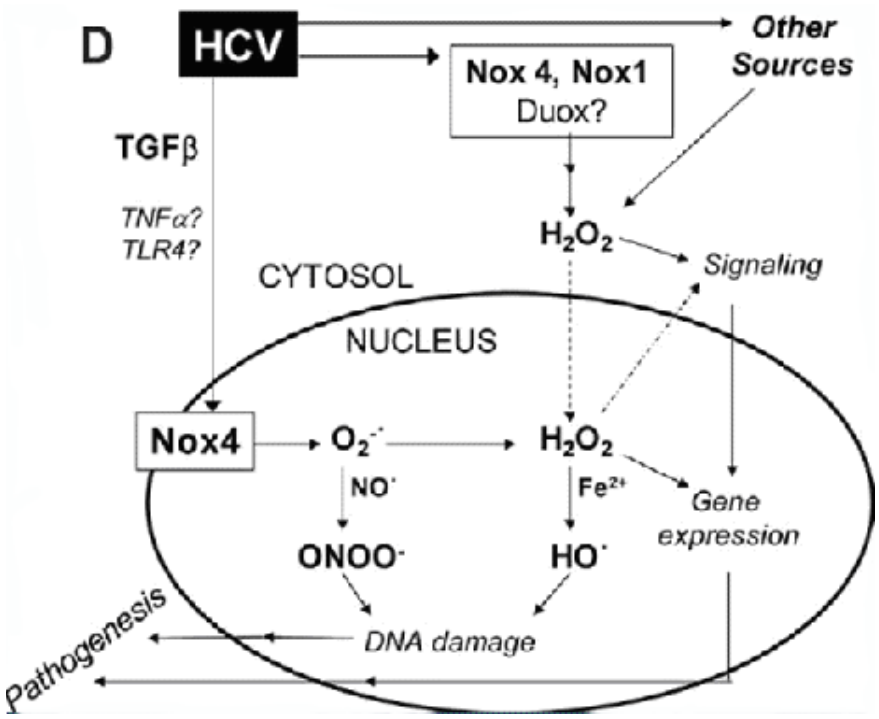


Figura 4 - Modelo proposto de hepatócitos de proteínas NOX na patogênese induzida do VHC (Adaptado de de Mochel et al. [43])

Em estudo com modelos de replicação de VHC *in vitro* e em fígado humano foram mostradas evidências de que a NOX1 e NOX4 hepatocitária estão persistentemente elevadas nos genótipos 2a e 1b do VHC, que o VHC aumenta a localização nuclear da NOX4, que as enzimas NOX hepatocitárias são fontes proeminentes de EROS e geração de peroxinitrito no núcleo durante a infecção pelo VHC, assim como o TGF-β apresenta um importante papel na modulação da NOX4 pelo VHC [42].

1.5 Polimorfismos das NADPH oxidases

A proteína $p22^{phox}$ é codificada pelo gene CYBA (citocromo b-245α), localizado no cromossomo 16q24. A $p22^{phox}$ requer a presença de uma isoforma da NOX, e estas isoformas da NOX requerem a presença da $p22^{phox}$ para expressão, visto que elas agem para estabilizar mutuamente uma a outra na membrana. Assim, variação na estrutura ou função da $p22^{phox}$ tem o potencial de influenciar a atividade de um número de isoformas da NOX, e isto poderia influenciar a geração de EROS em diversos tecidos e em diversas condições [44]. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) são variações na sequência do DNA que ocorrem quando um único nucleotídeo é trocado por outro, e é geralmente definido como tendo uma frequência maior que 1% na população. A constelação de diversos destes polimorfismos ocorrendo em uma região de um cromossomo, ou no caso de um gene, define um haplótipo. Diversos polimorfismos alélicos no gene $p22^{phox}$ têm sido relatados com consequências funcionais em humanos.

Um polimorfismo importante é o C242T, resultante da substituição da histidina por tirosina na posição de aminoácido 72, um potencial sítio de ligação do heme. O polimorfismo C242T tem uma forte influência na modulação da expressão da $p22^{phox}$, atividade da NADPH oxidase e geração vascular de O2. Isto leva a uma variação funcional significativa no estresse oxidativo vascular entre os indivíduos e, desta maneira, a uma variação na sua suscetibilidade para aterosclerose [45]. Um estudo analisou o papel desta variante em dois estudos de caso-controle e, em metanálise de trabalhos prévios, demonstrou-se um possível papel protetor do alelo T no polimorfismo C242T da $p22^{phox}$ na doença arterial coronariana em populações da Ásia, porém não em caucasianos [46]. O mesmo achado foi reportado numa metanálise que indica que diferenças na etnia e marcadores de ancestralidade podem causar disparidades nos resultados encontrados com relação a este SNP e o risco de doença arterial coronariana [47]. De fato, em estudos na população brasileira, houve associação do genótipo TT do polimorfismo C242T da $p22^{phox}$ com velocidade de onda de pulso mais alta, maior frequência e risco de espessamento arterial aumentado na população geral e em um grupo de indivíduos não hipertensos [48], assim como a presença do alelo T foi associada a maior massa ventricular em pacientes hipertensos [49].

Por outro lado, os genótipos CT/TT foram associados com um menor risco de síndrome metabólica em uma população chinesa [50] e associação deste polimorfismo com aterosclerose avançada de carótida em pacientes do Egito com diabetes tipo 2 [51]. Os pacientes diabéticos com o alelo 242T

(genótipo CT/TT) tiveram uma média de espessamento de íntima / média carotídea significantemente mais baixa que aqueles que não tinham o alelo 242T (genótipo CC), sugerindo que o alelo 242T poderia ser considerado protetor e o genótipo CC um fator de risco de aterosclerose em diabéticos no Egito [51].

Finalmente, em virtude da importância do sistema da NADPH oxidase no estresse oxidativo induzido pelo VHC, o objetivo deste estudo foi analisar a associação de dois SNPs nos genes codificadores da *NOX4* e $p22^{phox}$ (*CYBA*) com variáveis metabólicas e histológicas em pacientes portadores crônicos do VHC. O polimorfismo rs3017887 da *NOX4* foi escolhido, pois foi o SNP mais informativo (conseguiu capturar 12 entre 124 SNPs com frequência alélica menor de pelo menos 0,05) de um bloco de quatro polimorfismos associados ao estresse oxidativo [11]. O CYBA-675 T/A foi escolhido porque demonstrou-se previamente sua relação com uma maior produção de superóxido NADPH dependente [12].

2 Justificativa

Tendo em vista a progressão da doença fibrótica hepática em portadores do VHC e o possível papel do estresse oxidativo nesta evolução, torna-se importante a busca por marcadores genéticos capazes de identificar aqueles indivíduos com maior ou menor risco de progressão de doença. O sistema NADPH parece ser uma importante fonte de EROS, e estes estão relacionados com a evolução da doença inflamatória em pacientes com VHC. Porém, o papel dos polimorfismos do sistema NADPH nessa população e sua possível relação com progressão de doença e síndrome metabólica (SM) são desconhecidos. Desta maneira, idealizamos um estudo transversal que avaliasse a interferência desses polimorfismos em pacientes com hepatite crônica pelo vírus da hepatite C.

3 Objetivos

Objetivos primários

1- Avaliar a associação de dois polimorfismos (NOX4 E CYBA) no gene da NADPH oxidase com o grau de fibrose nos portadores de hepatite C crônica;

2- Estimar a associação destes polimorfismos com a síndrome metabólica nos portadores de hepatite C crônica.

Objetivos secundários

3- Avaliar a associação destes polimorfismos com inflamação hepática medida através de transaminases séricas em portadores de hepatite C crônica;

4- Avaliar a associação de dados clínicos com a síndrome metabólica e graus avançados de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica;

5- Avaliar a associação do carcinoma hepatocelular e graus avançados de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica.

4 Métodos

4.1 Desenho do estudo

Neste estudo transversal foram incluídos 178 pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos no ambulatório de Hepatologia do Instituto do Fígado e Transplantes de Pernambuco (IFP) e no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) da Universidade de Pernambuco (UPE) no período de fevereiro de 2012 a outubro de 2013.

4.2 Critérios de inclusão

- Portador de hepatite C crônica (PCR positivo para VHC) com idade de 18 a 70 anos, de ambos os sexos;
- Biópsia hepática compatível com hepatite crônica pelo VHC, tendo sido excluídas outras causas de hepatopatia crônica;
- Sem tratamento prévio para hepatite C;
- Consentimento informado.

4.3 Critérios de exclusão

- Outras causas de hepatopatia crônica, como esquistossomose, doença hepática gordurosa não alcoólica, outras hepatites virais, hepatite autoimune, doença de Wilson, deficiência de

alfa 1-antitripsina, hemocromatose e ingesta de álcool (> 100 g etanol/semana);

- Recusa em colaborar com a pesquisa.

4.4 Avaliação clínica

Houve uma avaliação clínica prévia do paciente, com exame físico, coleta de dados demográficos do prontuário, assim como revisão quanto à presença de comorbidades, tais como *diabetes mellitus* e dislipidemia, definidas segundo *Adult Treatment Panel III* (ATP III) (hipertrigliceridemia > 150 mg/dL; HDL colesterol < 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres; glicemia de jejum > 110 mg/dL) [52]. Próximo ao dia da realização da biópsia hepática, foram coletadas amostras de sangue para análise bioquímica. A classificação histológica usada para a avaliação da fibrose hepática foi a internacional francesa METAVIR, como demonstrado abaixo [53].

Critérios morfológicos para o estadiamento da fibrose na Classificação METAVIR

Classificação METAVIR: estadiamento	
Alteração histológica	Escore
Ausência de fibrose	F0
Expansão fibrosa portal sem septor	F1
Expansão fibrosa com raros septos	F2
Expansão fibrosa com numerosos septos, sem cirrose	F3
Cirrose	F4

Fonte: Adaptado de Bedossa; Poynard, 1996 [53].

4.6 Determinações bioquímicas

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram realizadas as análises bioquímicas e moleculares. Dentre as análises bioquímicas foram realizados os seguintes exames de sangue: hemograma completo, lipidograma, proteína total e frações, aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transpeptidase (GGT), bilirrubina total e frações, glicemia, marcadores para hepatite B e C, albumina, autoanticorpos hepáticos, perfil de ferro, cobre e ceruloplasmina sérica.

Amostras de sangue coletadas após jejum de 12 horas foram centrifugadas em até uma hora após a coleta para a separação de plasma, soro e células leucocitárias e armazenadas a -80°C. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Instituto do Fígado e Transplantes de Pernambuco. As concentrações de glicose foram determinadas pelo método enzimático da hexoquinase (Cobas, Roche, Suíça); a insulina, pelo método de quimioluminescência (Cobas, Roche, Suíça); o colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos, pelo método colorimétrico enzimático (Cobas, Roche, Suíça), e o colesterol LDL, pela equação de Friedwald [54].

4.7 Polimorfismo no gene da NADPH oxidase

A extração do DNA genômico de leucócitos e os experimentos de biologia molecular relacionados ao polimorfismo no gene da NADPH oxidase

p22phox foram realizados no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM/07) e no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde as amostras foram armazenadas para análise.

Foram separados 15 mL de sangue periférico de cada um dos pacientes para a extração do DNA genômico a partir de leucócitos e posterior genotipagem de cada um dos genes estudados. Foram avaliados os seguintes polimorfismos nos genes que codificam proteínas do sistema NADPH oxidase: [– 1435 C/A no gene NOX4 (rs3017887) e – 675 T/A no gene CYBA].

4.7.1 Extração do DNA genômico

Em um tubo graduado, foram acrescentados 15 mL de tampão Tris EDTA (TE) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) para cada 5 mL de sangue total. O tubo foi homogeneizado manualmente e, a seguir, centrifugado a 1.500 g durante 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi lavado em 15 mL de TE até sua dissolução total. Após a lavagem, realizou-se nova centrifugação e o sobrenadante foi desprezado. Essa lavagem foi repetida quatro vezes, até que o precipitado assumisse coloração esbranquiçada. Em seguida, foram adicionados ao precipitado:

- 3 mL de tampão A (25 mM de EDTA e 75 mM de NaCl)
- 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (Sigma)
- 100 µL de proteinase K (Sigma)

Essa solução foi incubada por 12 h a 37ºC e, após esse intervalo, adicionou-se 1 mL de NaCl 5 M. Após agitação vigorosa durante 30 min, o tubo foi centrifugado a 2.500 g durante 15 min, o precipitado desprezado e o sobrenadante recolhido em novo tubo.

Adicionou-se 10 mL de etanol absoluto gelado ao tubo, com posterior homogenização por inversão até o aparecimento de um precipitado fibrilar que foi transferido para novo tubo Eppendorff 1,5 mL e de tubo de microcentrífuga mantido à temperatura ambiente (TA) durante 30 min. O precipitado foi ressuspendido em 50-200 µL H_2O miliQ estéril e incubado a 37ºC durante 15 min. A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria (GeneQuant DNA/RNA Calculator, Pharmacia, LKC Biotechnology, Uppsala, Suécia). O DNA assim obtido foi armazenado à temperatura de –20ºC.

4.7.2 Genotipagem dos polimorfismos –1435 C/A no gene NOX4 (rs3017887) e –675 T/A no gene CYBA

Esses polimorfismos foram genotipados por PCR em tempo real, com a utilização de iniciadores específicos e sondas marcadas com os cromóforos VIC e FAM, que reconhecem cada um dos genótipos possíveis do polimorfismo. A PCR foi realizada com a utilização do kit comercial Taqman para aparelho StepOne Plus, Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), conforme as recomendações do fabricante.

4.8 Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da FMUSP e aprovado sob o número de protocolo: 09252613.8.1001.0068. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi fornecido aos pacientes, com leitura, compreensão e assinatura do documento previamente à participação no estudo.

4.9 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita por tabelas ou gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, média, mediana e desvio padrão. Em geral, os resultados foram demonstrados como média ± desvio padrão, exceto onde especificou-se de outra forma. Variáveis contínuas foram transformadas em log para análise quando a distribuição normal foi rejeitada pelo teste W de *Shapiro – Wilk.*

Para análise das variáveis qualitativas foi aplicado o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, ANOVA e ANCOVA para testar associação entre elas. Análise de regressão logística foi usada para identificar fatores independentes para os polimorfismos da *NOX4* e *CYBA* e suas variáveis clínicas e biológicas. Interação entre gênero e genótipo foi avaliada incluindo uma varável de validação cruzada (gênero/genótipo) em modelos de regressão logística (ANCOVA ou regressão logística). Quando duas SNPs foram testadas separadamente uma correção de Bonferroni foi

aplicada (P = 0,025 sendo significante), exceto onde especificado de outra forma. O poder de detectar associações relacionadas ao gênero nos SNPs com síndrome metabólica foi de aproximadamente 40%, para um OR =1,5 e alfa = 0,05. Em todas as avaliações estatísticas, o $p < 0,05$ foi considerado significativo e foi utilizado razão de chances e intervalo de confiança de 95%. As análises dos dados foram realizadas utilizando o software JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5 Resultados

As variáveis clínicas e bioquímicas de acordo com o grau de fibrose hepática estão expostas na Tabela 1. Dos 178 pacientes com hepatite C crônica neste estudo, observou-se que os graus de fibrose mais avançados (F3/F4) ocorreram em pacientes com faixa etária maior que os pacientes com grau de fibrose F1/F2. Também foi observado que os níveis séricos de AST, GGT e FA aumentavam de acordo com a severidade da fibrose. A frequência da SM foi significativamente maior em pacientes com fibrose F3/F4, como também demonstrado em relação à presença de carcinoma hepatocelular em pacientes com fibrose F4.

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes segundo o grau de fibrose em pacientes com hepatite C crônica

	F1	F2	F3	F4	*P*
N	52	53	37	36	
Idade*(anos)	53 ± 13	56 ± 9	60 ± 8	59 ± 11	0,05
Gênero: M/F (%)	44/56	57/43	38/62	53/47	0,29
VHC genótipo 1 (%)	57,7	56,6	78,4	75	0,18
VHC genótipo 2 (%)	7,7	3,8	2,7	5,6	
VHC genótipo 3 (%)	34,6	39,6	18,9	18,4	
Consumo de álcool (%)	58/27/15	49/32/19	67/19/14	61/11/28	0,38
Tabagismo (%)	33/8/59	47/11/41	38/8/54	31/8/61	0,58
Diabetes tipo 2 (%)	15	26	16	19	0,49
Hipertensão (%)	31	41	56	42	0,14
Síndrome metabólica (%)	*12*	*26*	*39*	*28*	*0,03*
Hepatocarcinoma (%)	*0*	*0*	*0*	*31*	*<0,001*
IMC (kg/m^2)	26,49 ± 3.93	26,17 ± 3.68	26,76 ± 5.43	26,67 ± 4.40	0,94
Circunferência abdominal (cm)	91,29 ± 11.53	92,07 ± 9.14	94,32 ± 13.18	95,78 ± 11.45	0,28
CT (mg/dL)*	169 ± 34	169 ± 36	174 ± 55	151 ± 33	0,12
LDL (mg/dL)*	101 ± 33	100 ± 37	107 ± 50	82 ± 23	0,08
HDL (mg/dL)	52 ± 15	47 ± 16	47 ± 19	49 ± 20	0,23
Triglicérides (mg/dL)*	91 ± 31	139 ± 145	115 ± 50	90 ± 30	0,34
Glicemia (mg/dL)*	96 ± 36	101 ± 32	101 ± 33	102 ± 25	0,36
ALT (U/L)	70 ± 36	96 ± 59	86 ± 57	84 ± 54	0,22
AST (U/L)	*49 ± 25*	*71 ± 52*a	*84 ± 49*a	*101 ± 74*a,b	*<0,0001*
GGT (U/L)	*67 ± 50*	*98 ± 108*	*122 ± 86*a	*150 ± 123*a,b	*<0,0001*
*FA (U/L)**	*78 ± 60*	*95 ± 65*	*92 ± 48*	*139 ± 80*a,b,c	*<0,0001*

Resultados expostos como média ± desvio padrão. Para análise das variáveis contínuas, foi aplicado o teste Shapiro-Wilk *W*, e se houve falha da variável neste teste transformou-se para log. Se mesmo assim a normalidade não tenha sido constatada, testes não paramétricos foram aplicados para estas variáveis (marcado por *). Análise ANOVA ou testes Kruskal-Wallis foram realizados, e os testes Tukey-Kramer HSD ou Dunn foram usados quando diferenças significativas foram observadas entre os grupos, sendo F1 (a), F2 (b), e F3 (c). Classes para etnia: caucasoide, negroide e afro-descendente. Classes para álcool: não bebe, < 40 g/dia, > 40 g/dia. Classes para tabagismo: ex-fumante, fumante, nunca fumou. Siglas: AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; CT, colesterol total; F, feminino; FA, fosfatase alcalina; GGT, gama-glutamiltransferase; HDL, lipoproteína de alta densidade; IMC, índice de massa corporal; LDL, lipoproteína de baixa densidade; M, masculino; P, valor-*p*. Valores de referência: glicose ≤ 100 mg/dL; triglicérides ≤ 150 mg/dL; HDL ≥ 40 mg/dL; LDL-C ≤ 130 mg/dL; CT ≤ 200 mg/dL; AST: homem 10 - 34 U/L, mulher 10 - 36 U/L; ALT: homem 10 - 44 U/L, mulher 10 - 36 U/L; GGT: homem 11 - 50 U/L, mulher 7 - 32 U/L; FA: homem 40 - 129 U/L, mulher 35 - 104 U/L. *P* < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo (dados em itálico).

No que se refere à associação entre os polimorfismos estudados da NADPH oxidase e os graus de fibrose e inflamação vistas à histologia, nenhuma associação foi encontrada entre as frequências dos genótipos dos SNPs *NOX4* rs3017887 (CC *versus* CA + AA) e *CYBA* −675 T → A (TT *versus* TA + AA) com inflamação (OR: 0,99; 95% IC: 0,45-2,14; *P* = 0,97 e OR: 0,99; 95% IC: 0,33-2,75; *P* = 0,99, para *NOX4* e *CYBA*, respectivamente) ou fibrose hepática (Tabela 2) na população total do estudo e na população estratificada por sexo ou tipos de genótipos do VHC.

Tabela 2 - Frequência genotípica de acordo com o grau de fibrose em pacientes do sexo masculino com hepatite C crônica

	F1 e F2	**F3 e F4**	**OR (95% IC)**	***P***
NOX4 (rs3017887)	*N* = 105	*N* = 73	0,60 (0,22 – 1,59)	0,31
CC	0,532	0,588		
CA	0,457	0,372		
AA	0,011	0,040		
MAF	0,239	0,226		
CYBA (675 T → A)			0,29 (0,06 – 1,11)	0,09
TT	0,800	0,882		
TA	0,190	0,118		
AA	0,010	0,000		
MAF	0,105	0,059		

Frequências genotípicas dos polimorfismos de nucleotídeo único *NOX4* rs3017887 e *CYBA* −675 T → A comparado com o estágio de fibrose em pacientes portadores de hepatite C crônica. Razão de chances ("Odds ratio" -OR) e 95% de intervalo de confiança (95% IC) para o alelo menor dos SNPs genotipados em um modelo dominante de análise de regressão logística ajustado para idade, gênero, síndrome metabólica, triglicérides, concentração sérica de albumina e genótipo do VHC. MAF, *minor allele frequency* – frequência do menor alelo (frequência do alelo mais raro, A para ambos os SNPs)

No que se refere aos exames bioquímicos, foi observada nos pacientes do sexo masculino uma associação nominal ($P > 0,025$ para $P \leq 0,05$) entre os genótipos CA + AA do SNP do *NOX4* com um menor nível sérico de ALT (CA + AA: 72,23 ± 6,34 U/L *versus* CC: 100,22 ± 9,85 U/L; $P = 0,05$). O genótipo TT do SNP de CYBA também teve relação estatisticamente significante com um menor nível sérico de ALT (TT = 84,01 ± 6,77 U/L *versus* TA + AA = 109,67 ± 18,37 U/L; $P = 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) em pacientes do sexo masculino com hepatite C crônica

	ALT (U/L)	***P***
NOX4 (rs3017887)[a]		
CC	100,22 ± 9,85	0,05
CA/AA	72,23 ± 6,34	
CYBA (−675 T → A)[b]		
TT	84,01 ± 6,77	0,05
TA/AA	109,67 ± 18,37	

Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) em pacientes masculinos com hepatite C crônica de acordo com o genótipo dos SNPs dos *NOX4* rs3017887 e *CYBA* −675 T → A. Resultados são média ± erro padrão da média.

[a] ANCOVA ajustado para idade, gênero, síndrome metabólica, gama-glutamiltransferase e genótipo do VHC.

[b] ANCOVA ajustado para idade, gênero, síndrome metabólica, pressão arterial sistólica, concentração sérica de albumina, IMC e genótipo do VHC.

A Tabela 4 mostra as frequências genotípicas do SNP rs3017887 *NOX4* de acordo com a presença ou não da SM na população do estudo estratificada pelo sexo; observou-se uma menor frequência da SM em pacientes do sexo masculino com genótipos CA + AA (CA + AA: 13,8% *versus* CC: 25,0%). Essa menor prevalência foi confirmada em um modelo dominante de análises de regressão logística que demonstrou um efeito protetor do alelo A (OR: 0,15; 95% IC: 0,03-0,79; *P* = 0,025). Nenhuma associação foi encontrada entre os SNPs e a presença ou não da SM quando a população estudada foi estratificada pelo tipo de genótipo do VHC.

Tabela 4 - Frequências genotípicas do polimorfismo de nucleotídeo único rs3017887 do *NOX4* relacionadas com a síndrome metabólica (SM)

***NOX4* (rs3017887)**	**Com SM**	**Sem SM**	**OR (95% IC)**	***P***
Feminino	(*N* = 63)	(*N* = 25)	1,71 (0,48 – 6,00)	0,40
CC	0,540	0,476		
CA	0,440	0,524		
AA	0,020	0,000		
MAF	0,240	0,321		
Masculino	(*N* = 66)	(*N* = 17)	0,15 (0,03 - 0,79)	0,025
CC	0,545	0,714		
CA	0,436	0,286		
AA	0,018	0,000		
MAF	0,236	0,143		

Frequências genotípicas do polimorfismo de nucleotídeo único rs3017887 do *NOX4* e síndrome metabólica em pacientes portadores de hepatite C crônica. Razão de chances ("Odds ratio" -OR) e 95% de intervalo de confiança (95% IC) para o alelo menor do SNP rs3017887 em um modelo dominante de análise de regressão logística ajustado para idade, gênero, diabetes tipo 2, IMC e genótipo do VHC. MAF, *minor allele frequency* – frequência do menor alelo (frequência do alelo mais raro, A para ambos os SNPs).

6 Discussão

No presente estudo, observou-se ausência de associação nas frequências genotípicas dos polimorfismos da NADPH oxidase, Nox4 (CC vs CA/AA) e CYBA (TT contra. TA/AA) entre os estágios de fibrose e inflamação em pacientes com hepatite C crônica. Por outro lado, de forma contraditória aos graus de inflamação, observou-se associação entre a presença do genótipo CC na Nox4 SNP com uma maior concentração de ALT na população em geral e associação entre alelo A da *NOX4* rs3017887 com uma menor prevalência da SM em pacientes do sexo masculino.

O VHC pode estimular a fibrogênese e inflamação por meio de interações entre os hepatócitos infectados, proteínas virais e as células estreladas hepáticas (HSCs) [14]. A proteína do *core* do HCV promove lesão na mitocôndria, alterando o transporte de elétrons com consequente aumento na produção de EROS [55,56]. Por outro lado, a proteína NS3 também ativa a proteína NADPH oxidase 2 e aumenta a produção de EROS [57], resultando no aumento do estresse oxidativo com consequente estímulo à inflamação e liberação de citocinas como TNF-α e TGF-β [58].

No presente estudo, não se observou associação do NOX4 e CYBA SNPs com o grau de inflamação e fibrose vistas à histologia hepática, mas observou-se com a ALT, que seria um marcador de atividade inflamatória. Embora o estresse oxidativo seja mais grave em pacientes cirróticos, claramente não é apenas um fenômeno de fase final, já que supostamente

ocorre mesmo antes quando os níveis das transaminases ainda estejam elevados. Estes efeitos, por sua vez, podem explicar o fato de que os polimorfismos funcionais que modulam a inflamação e/ou o estresse oxidativo podem ser simplesmente marcadores que são herdados em conjunto com outras variantes alélicas que predispõem ao estresse oxidativo e inflamação, mas que no vírus da hepatite C outras variáveis relacionadas ao próprio vírus e a fatores não herdados do hospedeiro possam explicar esta não associação [19,20].

Um outro aspecto já esperado mas não menos intrigante foi a associação entre a intensidade da fibrose e a presença do carcinoma hepatocelular na população de pacientes com VHC. A fibrose hepática é um fator de risco para o carcinoma hepatocelular (CHC); contudo, em que fase de fibrose o risco de CHC é aumentado tem sido pouco investigado. Recentemente, Tatsumi et al. demonstraram por meio da elastometria hepática que valores de corte da rigidez do fígado e sua associação com CHC são diferentes dependendo da etiologia. No VHC, a rigidez hepática de mais que 12,0 kPa foi um fator de risco independente para o desenvolvimento do CHC [59]. Todavia, como a amostra de pacientes com CHC é pequena, não se demonstrou associação com os polimorfismos.

A associação entre VHC e fatores metabólicos tem sido reconhecida como uma via de mão dupla. Se, por um lado, a infecção pelo VHC é capaz de induzir a resistência insulínica, esteatose e diabetes, por outro lado fatores metabólicos como a resistência insulínica podem modular o curso clínico da infecção pelo VHC, aumentando assim a predisposição para

fibrose hepática e CHC [60]. De acordo com estas observações, a SM foi significativamente mais frequente em pacientes com fibrose F3/F4 neste estudo. Curiosamente, foi encontrada uma associação entre o alelo menor A da *NOX4* rs3017887 com uma menor prevalência da SM, porém nenhuma associação foi observada entre rs3017887 e graus de fibrose ou inflamação hepática.

Não encontramos uma explicação para o efeito protetor exercido pelo alelo menor A da *NOX4* rs3017887 relacionado a SM, pois este mesmo SNP não influenciou a frequência da SM em pacientes com doença hepática gordorosa não alcoólica (DHGNA) (dados não mostrados). Uma possibilidade aventada seria a de que esse SNP se expressa somente na presença de um estímulo mais forte, como em uma infecção viral. Em outras palavras, isso pode ser um caso de interação gene (*NOX4* rs3017887) - ambiente (VHC): o SNP e o VHC juntamente influenciam o risco de desenvolvimento da SM, como já descrito em outras condições; por exemplo, dois SNPs no gene *CYP1A1* associados a um maior risco de desenvolver CHC somente quando fumantes [61]. Este fato sugere que, na infecção pelo VHC, os fatores virais e os fatores metabólicos são mais impactantes na progressão da fibrose que fatores genéticos do hospedeiro ligados a NADPH oxidase. Existem relatos de que adipocinas, tais como leptina e adiponectina, secretadas em pacientes com síndrome metabólica, podem causar fibrose hepática em vigência da doença hepática crônica [62,63,64]. Vários estudos já relataram a associação entre fibrose hepática e síndrome metabólica na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

[65] e descobriram que os componentes da síndrome metabólica são fatores de risco independentes para a fibrose hepática [66,67,68]. Associado a isso, a resistência insulínica (RI) tem um importante papel na fibrogênese hepática. A hiperinsulinemia pode estimular diretamente HSCs a produzir e a secretar matriz extracelular e, posteriormente, níveis elevados de glicose e insulina ativam o fator de crescimento do tecido conjuntivo, estimulando a fibrogênese hepática [56]. De acordo com os vários estudos, há maior progressão à fibrose hepática e à DHGNA em pacientes diabéticos, com síndrome metabólica e portadores do VHC por influência direta do vírus no metabolismo da glicose e dos lipídios [68,69,70,71].

Além disso, as proteínas estruturais e não estruturais do VHC induzem a alteração no metabolismo dos lipídios e ao acúmulo de gordura nos hepatócitos, ativando genes da proteína ligante do elemento regulador de esteroides-1 (SREBP-1). Ainda mais, o VHC reduz a taxa de excreção hepática de lipídios, diminuindo a secreção e o catabolismo, através de disfunção mitocondrial, da inibição da proteína microssomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*), assim como reduz a beta-oxidação, por inibir o receptor ativador do proliferador de peroxissoma alfa (PPAR α) [72,73]. A resistência à insulina parece ser uma característica central da patogênese da intolerância à glicose induzida por VHC e na fibrogênese [74-83]. Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado a maior prevalência de síndrome metabólica em pacientes com maior IMC e com idade mais avançada [84,85,86].

O risco de desenvolver SM por uma mutação no gene codificador de uma proteína da família da NADPH oxidase é plausível, pois este sistema

pró-oxidante é a principal fonte produtora de EROS nessa condição metabólica [87]. É importante ressaltar que nenhuma associação foi encontrada entre *NOX4* rs3017887 e qualquer componente da SM isoladamente, talvez porque o SNP exerce um efeito pleiotrópico fraco em cada componente da SM, que só fica evidente quando todos os componentes são considerados juntos. O alelo C do rs3017887 foi descrito em um bloco de haplotipo de quatro SNPs possivelmente associados com os danos do estresse oxidativo [88]; portanto, é provável que o alelo A esteja associado a um menor estresse oxidativo. Porém, até o presente momento, ainda não foi demonstrada nenhuma repercussão funcional direta do *NOX4* rs3017887, e também é possível que este SNP, em vez de ser o causador, seja apenas um marcador de outra variante funcional em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo.

A razão pela qual a associação foi observada em um sexo específico permanece para elucidação futura; entretanto, já foi vista uma associação referente ao sexo em outra patologia e genes associados ao estado redox [89].

Outros achados positivos do presente estudo foram as associações nominais dos genótipos CA+ AA do *NOX4* rs3017887 e do genótipo TT do *CYBA* −675 T → A com menores níveis de ALT. A associação do alelo A do rs3017887 é mais fácil de entender, pois uma menor atividade necrótica poderia ocorrer no contexto de um menor estresse oxidativo [90]. Porém, o alelo T do *CYBA* −675 T → A já foi previamente associado a uma maior produção de superóxidos NADPH-dependentes em monócitos e linfócitos periféricos [91], tornando sua associação com menores níveis séricos de ALT

inesperada. Entretanto, o efeito funcional de uma variante genômica em um tipo de célula não significa necessariamente o mesmo efeito em outro tipo de célula [92], e as repercussões funcionais do *CYBA* −675 T → A em hepatócitos nunca foram exploradas. Interessantemente, CYBA foi recentemente identificado como um fator do hospedeiro envolvido na entrada do VHC nos hepatócitos, mas os mecanismos por trás de sua participação nessa infecção viral atualmente permanecem desconhecidos [93]. Especula-se que o CYBA participa não somente da entrada do VHC, mas também da modulação da resposta dos hepatócitos à infecção pelo VHC, a depender do seu nível de expressão, o que poderia explicar a maior ou menor atividade necrótica em indivíduos diferentes com variantes genéticas distintas.

7 Conclusões

Verificou-se neste estudo:

1- ausência de associação dos polimorfismos NOX4 e CYBA do gene da NADPH oxidase com a fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica;

2- presença de associação do polimorfismo do gene $p22^{phox}$ NADPH oxidase com a síndrome metabólica em portadores de hepatite C crônica;

3- associação entre a presença do genótipo CC na Nox4 SNP com uma maior concentração de ALT na população em geral;

4- associação entre a presença de síndrome metabólica e graus avançados de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica;

5- associação entre a presença de carcinoma hepatocelular e graus avançados de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica.

8 Anexos

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □

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

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

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

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

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □

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

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Influência do Polimorfismo no Gene da NADPH Oxidase p22phox C242T na fibrose hepática e sua correlação com a síndrome metabólica nos portadores de vírus da hepatite C.

2.PESQUISADOR: PROF. DRA. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

CARGO/FUNÇÃO: PROF. LIVRE DOCENTE DO DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM 75499.

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X □ RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES

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

Convidamos o (a) senhor (a) para participar voluntariamente dessa pesquisa com objetivo de podermos descobrir o que esta faz o fígado evoluir para uma forma mais grave, como a fibrose hepática, e também entender o que vírus da hepatite C faz no fígado. Para essa pesquisa precisamos fazer um estudo completo do seu fígado, perguntaremos coisas sobre hábitos alimentares, faremos um breve exame físico, coletaremos um pouco de sangue para exames laboratoriais. Também anotaremos seu peso, altura, circunferência de abdome. A entrevista e o exame físico deverão ter uma duração média de 15-20 minutos.

PROCEDIMENTOS

A sua rotina no atendimento no ambulatório de Hepatologia do HC-FMUSP continuará a mesma, através de consultas médicas e exames feitos como habitual para acompanhamento e tratamento de pacientes portadores de hepatite C crônica. A rotina inclui exames de sangue e talvez uma biópsia de fígado, caso nunca tenha feito. A biópsia será realizada por meio de punção do fígado orientada por ecografia, sob anestesia local. Para isso, pedimos que nos deixem utilizar o resultado dos exames, nós manteremos em sigilo a sua identificação.

DESCONFORTOS E RISCOS

O exame de sangue apresenta pequeno desconforto e alguns riscos, como sangramento, hematoma, equimose e dor local. As biópsias de fígado são procedimentos realizados sem necessidade de internação, sob anestesia local e controle ecográfico. Ela pode provocar dor ou desconforto no local da punção ou ainda no ombro. Há alguns riscos, como sangramento ou derramamento de bile dentro do fígado ou da cavidade peritoneal (dentro do abdome), porém estes eventos costumam ser bastante raros. Ainda mais rara é a necessidade de cirurgia para controle destas complicações. Pode ocorrer óbito por biópsia hepática, mas isto é extremamente raro.

BENEFÍCIOS

As informações poderão trazer benefícios à sua pessoa sob a forma de orientação ambulatorial mais eficaz. Por outro lado, o conhecimento adquirido neste estudo poderá beneficiar outras pessoas. Não haverá nenhum custo extra para o(a) senhor(a) pela sua participação nessa pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se houver qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. A participação não condiciona qualquer vantagem na lista de espera para transplante de fígado, se for o caso.

CONFIDENCIALIDADE

As informações médicas geradas por esta pesquisa farão parte do seu prontuário hospitalar. Os resultados desse estudo poderão ser publicados em uma revista ou livro texto da área médica com a finalidade de ensinamento. Os autores se comprometem a usar os dados apenas com os propósitos desta pesquisa.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O(a) senhor(a) poderá solicitar mais informações a respeito do estudo a qualquer momento. Em qualquer etapa do estudo, o(a) senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é a Prof. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, que pode ser encontrada no endereço no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, telefone 2661-7830. Se o(a) senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contado com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069-6442, ramais 16,17,18 ou 20, fax 3069-6442, ramal 26, ou pelo email:

cappesq@hcnet.usp.br.

O(a) senhor(a) será informado sobre novas descobertas que possam influenciar a continuidade da sua participação na pesquisa.

RECUSA OU ABANDONO DO ESTUDO

O(a) senhor(a) está livre a recusar-se a participar, retirar o seu consentimento informado ou abandonar o referido projeto, a qualquer momento, sem prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa do estudo "Influência do Polimorfismo no Gene da NADPH Oxidase p22phox C242T na fibrose hepática e sua correlação com a síndrome metabólica nos portadores de vírus da hepatite C", de forma clara e detalhada, conforme especificados no termo de consentimento livre e esclarecido. Recebi informações específicas sobre os procedimentos aos quais serei submetido(a), seus desconfortos e riscos, bem como da utilização de material biológico para estudo.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão em participar deste estudo. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim.

Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Fui informado(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa, e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal Data _____/_____/_____

Assinatura da testemunha Data _____/_____/_____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data _____/_____/_____

SÃO PAULO, de de 2013.

9 Referências

1. Imunization. Vaccines and biological. (WHO). Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/.

2. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, Figueiredo GM, Montarroyos UR, Braga C, Turchi MD, Coral G, Crespo D, Lima ML, Alencar LC, Costa M, dos Santos AA, Ximenes RA. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. BMC Infect Dis. 2013;13:60.

3. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2005;42(4):962-73.

4. Pereira LM, Spinelli V, Ximenes RA, Cavalcanti MS, Melo R, Jucá N, Mizokami M, McFarlane IG. Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. J Med Virol. 2002;67(1):27-32.

5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol. 2007;13(17):2436-41.

6. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikluchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87(17):6547-9.

7. Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Cottone M, Rapicetta M, Marino L, Fiorentino G, Craxì A, Ciccaglione A, Giuseppetti R, et al. Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. A case-control study. Ann Intern Med. 1992;116(2):97-102.

8. Ren JM, Marshall BA, Mueckler MM, McCaleb M, Amatruda JM, Shulman GI. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. J Clin Invest. 1995;95(1):429-32.

9. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis. 2001;21(3):351-372.

10. Guo JS, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis. 2007; 27(4):413-26.

11. Lefkowitch JH, Schiff ER, Davis GL, Perillo RP, Lindsay K, Bodenheimer Jr HC, Balart LA, Ortego TJ, Payne J, Dienstag JL, et al. Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. Gastroenterology. 1993;104(2):595-603.

12. Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM. The pathology of hepatitis C. Hepatology. 1992;15(4):567-71.

13. Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. Semin Liver Dis. 1995;15(1):70-81.

14. Bataller R, Sancho B, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolás JM, Jiménez W, Weich N, Gutiérrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodés J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. Gastroenterology. 2003;125(1):117-25.

15. Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. Recruitment of lymphocytes to the human liver. Immunol Cell Biol. 2002;80(1):52-64.

16. Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucc L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A, Folli F. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. Hepatology. 1999;29(6):1743-1751.

17. Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2001;34(4 Pt 1):738-744.

18. Paradis V, Dargere D, Vidaud M, de Gouville A-C, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratziu V, Bedossa P. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. Hepatology. 1999;30(4):968-976.

19. 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.

20. Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. Trends Endocrinol Metabol. 2010;21(1):33-40.

21. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: epidemiology and pathogenesis. Diabetes Care. 2006;29(5):1140-9.

22. Ge J, Ding Z, Song Y, Wang F. Smoking dose modifies the association between C242T polymorphism and prevalence of metabolic syndrome in a Chinese population. PLoS One. 2012;7(3):e31926.

23. Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Ronchi JA, Pio-Magalhães JA, Cipolli JA, Matos-Souza JR, Mill JG, Vercesi AE, Krieger JE, Franchini KG, Pereira AC, Nadruz Junior W. The C242T polymorphism of the p22-phox gene (CYBA) is associated with higher left ventricular mass in Brazilian hypertensive patients. BMC Med Genet. 2011;12:114.

24. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. Mol Cell Endocrinol. 2009;302(2):148-158.

25. Paik YH, Iwaisako K, Seki E, Inokuchi S, Schnabl B, Osterreicher CH, Kisseleva T, Brenner DA. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. Hepatology. 2011;53(5):1730-1741.

26. Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. J Biol Chem. 2004;279(50):51715-8.

27. Chiang E, Dang O, Anderson K, Matsuzawa A, Ichijo H, David M. Cutting edge: apoptosis-regulating signal kinase 1 is required for reactive oxygen species-mediated activation of IFN regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. J Immunol. 2006;176(10):5720-4.

28. Patel DN, Bailey SR, Gresham JK, Schuchman DB, Shelhamer JH, Goldstein BJ, Foxwell BM, Stemerman MB, Maranchie JK, Valente AJ, Mummidi S, Chandrasekar B. TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide- induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006;347(4):1113-20.

29. Dooley S, Ten Dijke P. TGF-β in progression of liver disease. Cell Tissue Res. 2012;347(1):245-56.

30. Einav S, Koziel MJ. Immunopathogenesis of hepatitis C virus in the immunosuppressed host. Transpl Infect Dis. 2002;4(2):85-92.

31. Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Béraud M, Gonindard C, Alric L, Vinel JP, Pipy B. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. J Biol Chem. 2001;276(25):23077-83.

32. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. Gastroenterology. 2002;122(2):366-75.

33. Thorén F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. J Leukoc Biol. 2004;76(6):1180-6.

34. Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006;290(5):G847-51.

35. Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. J Hepatol. 1995;22(4):449-56.

36. Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, Jendrysik MA, Leto TL. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. J Virol. 2009;83(24):12934-46.

37. Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, Soldini M, Giancaspro G, Bellomo G, Belloni G, Grisorio B, Barbarini G. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. J Hepatol. 1999;30(5):774-782.

38. Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. J Hepatol. 1995;22(4):449-456.

39. Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. Gastroenterology. 1992;102(6): 2108-2113.

40. Lin Q, Fang D, Hou X, Le Y, Fang J, Wen F, Gong W, Chen K, Wang JM, Su SB. HCV peptide (C5A), an amphipathic α-helical peptide of hepatitis virus C, is an activator of N-formyl peptide receptor in human phagocytes. J Immunol. 2011;186(4):2087-94.

41. Choi J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. Free Radic Biol Med. 2012;52(7):1135-50.

42. Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, Jendrysik MA, Leto TL. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. J Virol. 2009;83(24):12934-46.

43. de Mochel NS, Seronello S, Wang SH, Ito C, Zheng JX, Liang TJ, Lambeth JD, Choi J. Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. Hepatology. 2010;52(1):47-59.

44. Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O, Stasia MJ, Antonarakis SE, Krause KH. Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. Hum Mutat. 2009;30(7):1123-33.

45. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. Circulation. 2000;102(15):1744-7.

46. Di Castelnuovo A, Soccio M, Iacoviello L, Evangelista V, Consoli A, Vanuzzo D, Diviacco S, Carluccio M, Rignanese L, De Caterina R. The C242T polymorphism of the p22phox component of NAD(P)H oxidase and vascular risk. Two case-control studies and a meta-analysis. Thromb Haemost. 2008;99(3):594-601.

47. Fang S, Wang L, Jia C. Association of p22phox gene C242T polymorphism with coronary artery disease: a meta-analysis. Thromb Res. 2010;125(5):e197-201.

48. de Oliveira Alvim R, Santos PC, Dias RG, Rodrigues MV, de Sa Cunha R, Mill JG, Junior WN, Krieger JE, Pereira AC. Association between the C242T polymorphism in the p22phox gene with arterial stiffness in the Brazilian population. Physiol Genomics. 2012;44(10):587-92

49. Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Ronchi JA, Pio -Magalhães JA, Cipolli JA, Matos-Souza JR, Mill JG, Vercesi AE, Krieger JE, Franchini KG, Pereira AC, Nadruz Junior W. The C242T polymorphism of the p22-phox gene (CYBA) is associated with higher left ventricular mass in Brazilian hypertensive patients. BMC Med Genet. 2011;12:114.

50. Ge J, Ding Z, Song Y, Wang F. Smoking dose modifies the association between C242T polymorphism and prevalence of metabolic syndrome in a Chinese population. PLoS One. 2012;7(3):e31926.

51. Farrag W, Eid M. Association of the C242T polymorphism of the p22 phox gene with advanced carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. Mol Med Rep. 2008;1(5):679-84.

52. Executive Summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NECP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001;285(19):2486-97.

53. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. Hepatology. 1996;24(2):289-293.

54. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.

55 Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J, Weinman SA. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. J Biol Chem. 2005;280(45):37481-37488.

56 Sheikh MY, Choi J, Qadri I, Friedman JE, Sanyal AJ. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. Hepatology. 2008;47(6):2127-33.

57 Thorén F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. J Leukoc Biol. 2004;76(6):1180-1186.

58 De Maria N, Colantoni A, Fagiuoli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. Free Radic Biol Med. 1996;21(3):291-295.

59 Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2015;45(5):523-32.

60. Kawaguchi Y, Mizuta T. Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. World J Gastroenterol. 2014;20:2888-901.

61. Yu L, Sun L, Jiang YF, Lu BL, Sun DR, Zhu LY. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and cigarette smoking are associated with the risk of hepatocellular carcinoma: evidence from epidemiological studies. Mol Biol Rep. 2012;39:6641-6.

62 Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue: emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2005;2(6):273-280.

63 Wong VW, Hui AY, Tsang SW, Chan JL, Tse AM, Chan KF, So WY, Cheng AY, Ng WF, Wong GL, Sung JJ, Chan HL. Metabolic and adipokine profile of Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006;4(9):1154-1161.

64 Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Hadziyannis E, Georgiou A, Kafiri G, Tiniakos DG, Manesis EK, Archimandritis AJ. Serum adipokine levels in chronic liver diseases: association of resistin levels with fibrosis severity. Scand J Gastroenterol. 2008;43(9):1128-1136.

65 Wong VW, Chan HL, Hui AY, Chan KF, Liew CT, Chan FK, Sung JJ. Clinical and histological features of non-alcoholic fatty liver disease in Hong Kong Chinese. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20(1):45-49.

66 Nugent C, Younossi ZM. Evaluation and management of obesity-related nonalcoho lic fatty liver disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2007;4(8):432-441.

67 Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP, Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Therneau TM, Day CP. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. Hepatology. 2007;45(4):846-854.

68 Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond). 2009;116(7):539-564.

69 Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD. Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. Cleve Clin J Med. 2008;75(12):881-889.

70 Negro F, Clément S. Impact of obesity, steatosis and insulin resistance on progression and response to therapy of hepatitis C. J Viral Hepat. 2009;16(10):681-8.

71 Younossi ZM, McCullough AJ. Metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C virus: impact on disease progression and treatment response. Liver Int. 2009;29 Suppl 2:3-12.

72 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.

73 Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2010;21(1):33-40.

74 Thanopoulou A, Karamanos B, Angelico F, Assaad-Khalil S, Djordjevic P, Katsilambros N, Migdalis I, Mrabet M, Petkova M, Roussi D, Tenconi MT, Archimandritis A. Epidemiological evidence for the non-random clustering of the components of the metabolic syndrome: multicentre study of the Mediterranean Group for the Study of Diabetes. Eur J Clin Nutr. 2006; 60(12):1376-1383.

75 Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA. 2002;287(3):356-359.

76 Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. Ann Intern Med. 2000;133(8): 592-599.

77 Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, Szklo M, Thomas DL. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. Hepatology. 2003;38(1):50-56.

78 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):416-423.

79 Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Hanada S, Koga H, Sata M. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. Am J Gastroenterol. 2007;102(3):570-576.

80 Allison ME, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. J Hepatol. 1994;21(6):1135-1139.

81 Mason AL, Lau JY, Hoang N, Qian K, Alexander GJ, Xu L, Guo L, Jacob S, Regenstein FG, Zimmerman R, Everhart JE, Wasserfall C, Maclaren NK, Perrillo RP. Association of diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. Hepatology. 1999;29(2):328-333.

82 Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. Hepatology. 1999;30(4):1059-1063.

83 Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chou P. Community-based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis severity status. Am J Epidemiol. 2003;158(12): 1154-1160.

84 Rao GA, Pandya PK. Statin therapy improves sustained virologic response among diabetic patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2011;140(1):144-152.

85 White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. J Hepatol. 2008;49(5):831-844.

86 Athyros VG, Bouloukos VI, Pehlivanidis AN, Papageorgiou AA, Dionysopoulou SG, Symeonidis AN, Petridis DI, Kapousouzi MI, Satsoglou EA, Mikhailidis DP; MetS-Greece Collaborative Group. The prevalence of the metabolic syndrome in Greece: the MetS-Greece Multicentre Study. Diabetes Obes Metab. 2005;7(4):397-405.

87 Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. J Pathol. 2013;231(3):290-300.

88 Lim SC, Liu JJ, Low HQ, Morgenthaler NG, Li Y, Yeoh LY, Wu YS, Goh SK, Chionh CY, Tan SH, Kon YC, Soon PC, Bee YM, Subramaniam T, Sum CF, Chia KS. Microarray analysis of multiple candidate genes and associated plasma proteins for nephropathy secondary to type 2 diabetes among Chinese individuals. Diabetologia. 2009;52(7):1343-51.

89 Monteiro MB, Patente TA, Mohammedi K, Queiroz MS, Azevedo MJ, Canani LH, Parisi MC, Marre M, Velho G, Corrêa-Giannella ML. Sex-specific associations of variants in regulatory regions of NADPH oxidase-2 (CYBB) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) genes with kidney disease in type 1 diabetes. Free Radic Res. 2013;47(10):804-10.

90 Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. Free Radic Biol Med. 2003;34:1-10.

91 Moreno MU, San José G, Fortuño A, Beloqui O, Redón J, Chaves FJ, Corella D, Diez J, Zalba G. A novel CYBA variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. J Hypertens. 2007;25(8):1620-6.

92 Meaney MJ. Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions. Child Dev. 2010;81:41-79.

93 Li Q, Zhang YY, Chiu S, Hu Z, Lan KH, Cha H, Sodroski C, Zhang F, Hsu CS, Thomas E, Liang TJ. Integrative functional genomics of hepatitis C virus infection identifies host dependencies in complete viral replication cycle. PLoS Pathog. 2014;10:e1004163.