

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

THAMIRIS VAZ GAGO PRATA

Influência de polimorfismos no gene *MTTP* nos níveis de lipídeos e na esteatose associada à infecção crônica pelo vírus da hepatite C

**São Paulo
2023**

THAMIRIS VAZ GAGO PRATA

Influência de polimorfismos no gene *MTTP* nos níveis de lipídeos e na esteatose associada à infecção crônica pelo vírus da hepatite C

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Mariana Cavalheiro Magri
Co-Orientadora: Profa. Dra. Fátima Mitiko Tengan

São Paulo

2023

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
Influência de polimorfismos no gene MTTP nos
níveis de lipídeos e na esteatose associada à infecção
crônica pelo vírus da hepatite C / Thamiris Vaz Gago
Prata. -- São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Mariana Cavalheiro Magri.
Coorientadora: Fátima Mitiko Tengan.

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

USP/FM/DBD-330/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Prata TVG. Influência de polimorfismos no gene *MTTP* nos níveis de lipídeos e na esteatose associada à infecção crônica pelo vírus da hepatite C [doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Dedico esse trabalho aos protagonistas dessa história: todos os indivíduos portadores de hepatite C.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Elisabete, pelo apoio incondicional e por sempre me incentivarem a continuar buscando novos desafios.

À minha irmã, Cynthia, por todo o carinho, apoio e força nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido Pedro, que compartilha essa caminhada comigo, incentivando e vibrando a cada conquista.

À minha orientadora Profa. Dra. Mariana Cavalheiro Magri, por tantos ensinamentos durante esses anos. Sou muito grata por todas as oportunidades, confiança, paciência, disponibilidade e ajuda em diversos momentos. Foi uma honra ter sido sua aluna!

À minha co-orientadora Profa. Dra. Fátima Mitiko Tengan, por todo o auxílio, ensinamentos e oportunidades de crescimento concedidas durante esses anos.

Aos Professores Dr. Edson Abdala, Dra. Alice Tung Wan Song e Dra. Nayara Izabel Viana pelas diversas contribuições e recomendações durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Antonio Alci Barone, um grande exemplo para todos.

A toda a equipe do LIM-47, pela amizade, apoio e ajuda com esse trabalho. Além disso, sou muito grata por tantos momentos alegres e pelo convívio nesses anos.

Agradeço o Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver meu projeto de pesquisa que resultou nessa tese de doutorado.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

A presente tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP - Parte IV (Vancouver) Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver)/ Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3.ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016.

ISBN: 978-85-7314-056-9

DOI: 10.11606/9788573140569

RESUMO

Prata TVG. Influência de polimorfismos no gene *MTTP* nos níveis de lipídeos e na esteatose associada à infecção crônica pelo vírus da hepatite C [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A evolução da infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) está associada a diversos fatores. A esteatose hepática é uma característica histológica frequente em portadores crônicos do HCV e tem impacto significativo na progressão para fibrose. Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes como o gene proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (*MTTP*) estão envolvidos no metabolismo lipídico e podem predispor ao desenvolvimento de esteatose. Esse estudo teve como objetivo identificar SNPs no gene *MTTP* em portadores crônicos do HCV e em indivíduos saudáveis, e correlacioná-los com níveis de lipídeos plasmáticos, resistência à insulina e esteatose hepática em portadores crônicos do HCV. A genotipagem dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E foi realizada utilizando a técnica de PCR-RFLP. Foi avaliada a associação de características demográficas, clínicas e laboratoriais do hospedeiro com os genótipos de cada SNP em diferentes modelos genéticos, e realizadas análises estatísticas bivariadas e multivariadas. Dos 236 portadores crônicos do HCV, 56,4% eram do sexo feminino e a média de idade foi de 55,5 anos. Dos 241 indivíduos saudáveis, 65,6% eram do sexo feminino e a média de idade foi de 43,3 anos. A esteatose estava presente em 53% dos portadores crônicos do HCV. A frequência dos alelos mutados de cada SNP detectado foi > 5% em ambos os grupos, e as distribuições dos genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$). Não foi observada associação entre os níveis de lipídeos plasmáticos com os SNPs -493G/T, I128T, Q95H e Q244H nos portadores crônicos do HCV ($p > 0,05$). Na análise multivariada foi observada que a presença do alelo mutado do SNP -493G/T e do I128T, ambos em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV, aumentou em 11,51 vezes ($p=0,005$) e 8,51 vezes ($p=0,012$), respectivamente, a chance de apresentar esteatose. Na análise de interação entre os polimorfismos, o -493G/T e o -164T/C apresentaram uma interação estatisticamente significativa com aumento em 12,83 vezes a chance de apresentar esteatose ($p=0,048$). Os polimorfismos avaliados não influenciaram estatisticamente a presença de resistência à insulina em

portadores crônicos do HCV ($p > 0,05$). Foi realizado um teste de haplótipos para avaliar o efeito combinado dos polimorfismos no gene *MTTP* na esteatose e na resistência à insulina, e nenhuma combinação apresentou associação estatisticamente significativa com a esteatose ($p > 0,05$). Entretanto, o haplótipo TACGTGG para os SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E, respectivamente, foi associado com a presença de resistência à insulina ($p = 0,028$). Além disso, o haplótipo TTGGTGC pode ser um fator de proteção para a presença de resistência à insulina nessa população ($p = 0,012$). Dados do presente estudo demonstraram uma associação da infecção pelo genótipo 3 do HCV em conjunto com os SNPs -493G/T e I128T na esteatose. Além disso, os resultados revelaram que a presença dos alelos mutados dos SNPs -493G/T e -164T/C pode influenciar no desenvolvimento de esteatose em portadores crônicos do HCV. Portanto, pode-se observar que SNPs no gene *MTTP* exercem influência na esteatose hepática associada à hepatite C crônica.

Palavras-chave: Hepatite C crônica. Polimorfismo de nucleotídeo único. Fígado gorduroso. Lipídeos. Frequência do gene. Resistência à insulina.

ABSTRACT

Prata TVG. The influence of *MTTP* gene polymorphisms on lipid levels and steatosis associated with chronic hepatitis C virus infection [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

The course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection is associated with several factors. Liver steatosis is a frequent histological feature in chronic HCV carriers and has a significant impact on progression to fibrosis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes such as the microsomal triglyceride transfer protein (*MTTP*) gene are involved in lipid metabolism and may predispose to the development of steatosis. Identify SNPs in the *MTTP* gene in chronic HCV carriers and healthy individuals, and correlate the SNPs with plasma lipid levels, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic HCV carriers was the aim of this study. The genotyping of -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H and Q244E SNPs in the *MTTP* gene was performed using the PCR-RFLP technique. The association of demographic, clinical and laboratory characteristics of the host with the genotypes of each SNP in different genetic models was evaluated, in addition, bivariate and multivariate statistical analysis was performed. Of the 236 chronic HCV carriers included in the study, 56.4% were female and the mean age was 55.5 years. Of the 241 healthy individuals, 65.6% were female and the mean age was 43.3 years. Liver steatosis was present in 53% of the chronic HCV carriers. The frequency of mutated alleles of each SNP was > 5% in both groups and genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p \geq 0.05$). There was no association between plasma lipid levels and the -493G/T, I128T, Q95H and Q244H SNPs in chronic HCV carriers ($p > 0.05$). In the multivariate analysis, it was observed that the presence of the mutated allele of the -493G/T and I128T SNPs both combined with the HCV genotype 3 infection increased by 11.51 times ($p = 0.005$) and 8.51 times ($p = 0.012$), respectively, the chance of developing hepatic steatosis. In the interaction analysis between the polymorphisms, -493G/T and -164T/C SNPs presented a statistically significant interaction with a 12.83-fold increase in the chance of develop steatosis ($p = 0.048$). The evaluated polymorphisms did not statistically influence the presence of insulin resistance in chronic HCV carriers ($p > 0.05$). A haplotype-based association test was performed evaluating the combined effect of polymorphisms in the *MTTP* gene on

steatosis and insulin resistance; it was not observed a statistically significant association with haplotype combination and steatosis ($p>0.05$). However, the TACGTGG haplotype for the -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H and Q244E SNPs, respectively, was associated with the presence of insulin resistance in chronic HCV carriers ($p=0.028$). Furthermore, the TTGGTGC haplotype may be a protective factor for the presence of insulin resistance in this population ($p=0.012$). Data from the present study demonstrated an association of HCV genotype 3 infection combined with the -493G/T and I128T SNPs in the *MTTP* gene in steatosis. In addition, the results revealed that the presence of mutated alleles of the -493G/T and -164T/C SNPs in the *MTTP* gene can influence the development of steatosis in chronic HCV carriers. Therefore, it can be observed that SNPs in the *MTTP* gene influence hepatic steatosis associated with chronic hepatitis C.

Keywords: Hepatitis C, chronic. Polymorphism, single nucleotide. Fatty liver. Lipids. Gene frequency. Insulin resistance.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Distribuição global de genótipos do HCV	3
Figura 2 - Esquema representativo da história natural da hepatite C	7
Figura 3 - Cromossomos humanos, evidenciando o cromossomo 4 no qual está localizado o gene <i>MTTP</i>	15
Figura 4 - Fluxograma de seleção do Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV	31
Figura 5 - Fluxograma de seleção do Grupo 2 - Indivíduos saudáveis	32
Figura 6 - Comparação do volume de eluição com a concentração (A) e pureza (B) usando o kit ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System	36
Figura 7 - Alinhamento do primer <i>forward</i> utilizado na detecção do polimorfismo I128T com a sequência de referência do gene <i>MTTP</i> usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit entre a posição 19268 e 19293	38
Figura 8 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo -164T/C A) Mapa da sequência completa de 220 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 20 ao 79, destacando a posição de corte (nucleotídeo 50) da enzima de restrição <i>BsrI</i>	42
Figura 9 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo -400A/T 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>	43
Figura 10 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo H297Q 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>	44
Figura 11 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo -493G/T A) Mapa da sequência completa de 109 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 50 ao 109, destacando a posição de corte (nucleotídeo 89) da enzima de restrição <i>HphI</i>	45
Figura 12 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo I128T A) Mapa da sequência amplificada de 199 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 139 ao 198, destacando a posição de corte (nucleotídeo 167) da enzima de restrição <i>BsrI</i>	46

Figura 13 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo Q95H	47
A) Mapa da sequência amplificada de 183 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 4 ao 63, destacando a posição de corte (nucleotídeo 35) da enzima de restrição <i>PstI</i>	
Figura 14 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene <i>MTTP</i> incluindo o polimorfismo Q244E	48
A) Mapa da sequência completa de 201 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 118 ao 177, destacando a posição de corte (nucleotídeo 149) da enzima de restrição <i>Bfal</i>	
Figura 15 - Amostras representativas do padrão eletroforético de produtos de cada PCR. Padrão de peso molecular: 50 pb (pares de base)	62
A) Observação da banda de 109 pb para genotipagem do polimorfismo -493G/T no gene <i>MTTP</i> . B) Observação da banda de 199 pb para genotipagem do polimorfismo I128T no gene <i>MTTP</i> . C) Observação da banda de 183 pb para genotipagem do polimorfismo Q95H no gene <i>MTTP</i> . D) Observação da banda de 201 pb para genotipagem do polimorfismo Q244E no gene <i>MTTP</i>	
Figura 16 - Amostras representativas do padrão eletroforético de produtos de RFLP. Padrão de peso molecular: 50 pb (pares de base)	64
A) Representação dos genótipos do polimorfismo -493G/T no gene <i>MTTP</i> . 1) Homozigoto selvagem: GG. 2) Heterozigoto: GT. 3) Homozigoto mutado: TT. B) Representação dos genótipos do polimorfismo I128T no gene <i>MTTP</i> . 1) Homozigoto selvagem: II. 2) Heterozigoto: IT. 3) Homozigoto mutado: TT. C) Representação dos genótipos do polimorfismo Q95H no gene <i>MTTP</i> . 1) Homozigoto selvagem: QQ. 2) Heterozigoto: QH. 3) Homozigoto mutado: HH. D) Representação dos genótipos do polimorfismo Q244E no gene <i>MTTP</i> . 1) Heterozigoto: QE. 2) Homozigoto selvagem: QQ	
Figura 17 - Características associadas à esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV	122
Figura 18 - Características associadas à resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV	123
Gráfico 1 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o genótipo do vírus	57
Gráfico 2 - Frequência genotípica encontrada em cada SNP avaliado no gene <i>MTTP</i> nos 236 portadores crônicos do HCV	65
Gráfico 3 - Gráfico de desequilíbrio de ligação com base nos dados dos genótipos de sete SNPs no gene <i>MTTP</i> em portadores crônicos do HCV. Os valores de D' são indicados em cada quadrado; quanto mais intensa a cor vermelha maior o desequilíbrio de ligação	67
Gráfico 4 - Frequência genotípica encontrada em cada SNP avaliado no gene <i>MTTP</i> nos 241 indivíduos saudáveis	68
Gráfico 5 - Gráfico de desequilíbrio de ligação com base nos dados dos genótipos de sete SNPs no gene <i>MTTP</i> em indivíduos saudáveis. Os valores de D' são indicados em cada quadrado; quanto mais intensa a cor vermelha maior o desequilíbrio de	69

ligação

Gráfico 6 - Frequência dos alelos do haplótipo TACGTGG associado com a presença de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV 119

Gráfico 7 - Frequência dos alelos do haplótipo TTGGTGC associado com a proteção de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV 120

Gráfico 8 - Características genéticas dos SNPs no gene MTTP nos portadores crônicos do HCV e nos indivíduos saudáveis 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos estudos de associação de polimorfismos no gene <i>MTTP</i> com diversas patologias	18
Tabela 2 - Descrição dos estudos de associação de polimorfismos no gene <i>MTTP</i> com a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)	21
Tabela 3 - Descrição dos estudos de associação de polimorfismos no gene <i>MTTP</i> com a hepatite C	24
Tabela 4 - Descrição dos reagentes incluídos no protocolo da PCR com volume final de 16,7 μ L para detecção dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i>	39
Tabela 5 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de amplificação do gene <i>MTTP</i> , tamanho do fragmento amplificado e temperatura de pareamento dos <i>primers</i>	40
Tabela 6 - Enzimas de restrição de endonuclease, concentração das enzimas, temperatura de digestão e perfis genotípicos observados no gel de agarose após reação de RFLP para os polimorfismos no gene <i>MTTP</i>	49
Tabela 7 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o sexo, faixa etária, IMC, comorbidades, antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do HCV, etilismo e tabagismo	56
Tabela 8 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com os exames laboratoriais	57
Tabela 9 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com as características anatomopatológicas encontradas em fragmento hepático	58
Tabela 10 - Fatores associados à presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236)	59
Tabela 11 - Exames laboratoriais associados à presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236)	60
Tabela 12 - Análise multivariada dos fatores associados à presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236)	61
Tabela 13 - Frequência alélica encontrada em cada polimorfismo avaliado no gene <i>MTTP</i> nos 236 portadores crônicos do HCV e resultado do equilíbrio de Hardy-Weinberg	66
Tabela 14 - Frequência alélica encontrada em cada polimorfismo avaliado no gene <i>MTTP</i> nos 241 indivíduos saudáveis e resultado do equilíbrio de Hardy-Weinberg	69
Tabela 15 - Comparação do número total de alelos e genótipos de cada polimorfismo no gene <i>MTTP</i> entre os portadores crônicos do HCV (Grupo 1) e os indivíduos saudáveis (Grupo 2)	71

Tabela 16 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	74
Tabela 17 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	76
Tabela 18 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	78
Tabela 19 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	80
Tabela 20 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	81
Tabela 21 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	82
Tabela 22 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com os modelos codominante, dominante e recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação	83
Tabela 23 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo -493G/T no modelo dominante (GG vs GT/TT)	84
Tabela 24 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo -493G/T com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV	85
Tabela 25 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	86
Tabela 26 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	88
Tabela 27 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	90
Tabela 28 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	92
Tabela 29 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	93

Tabela 30 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	94
Tabela 31 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com os modelos codominante, dominante e recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação	95
Tabela 32 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo I128T no modelo dominante (II vs IT/TT)	96
Tabela 33 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo I128T com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV	97
Tabela 34 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação	98
Tabela 35 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação	100
Tabela 36 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com modelo codominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação	102
Tabela 37 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação	103
Tabela 38 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com o modelo codominante e modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação	104
Tabela 39 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo Q95H no modelo dominante (QQ vs QH/HH)	105
Tabela 40 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo Q95H com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV	106
Tabela 41 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o polimorfismo Q244H e resultado dos testes de associação	107
Tabela 42 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o polimorfismo Q244E e resultado dos testes de associação	109
Tabela 43 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com o polimorfismo Q244E e resultado do teste de associação	109
Tabela 44 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo Q244E (QQ vs QE)	110

Tabela 45 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo Q244E com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV	111
Tabela 46 - Resultado da análise de interação de primeira ordem entre os polimorfismos no gene <i>MTTP</i> de acordo com a esteatose nos portadores crônicos do HCV (n=236)	112
Tabela 47 - Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i> de acordo com a esteatose nos portadores crônicos do HCV (n=236)	113
Tabela 48 - Fatores associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)	114
Tabela 49 - Exames laboratoriais associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)	115
Tabela 50 - Polimorfismos genéticos no gene <i>MTTP</i> no modelo dominante associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)	116
Tabela 51 - Análise multivariada dos fatores associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)	117
Tabela 52 - Regressão logística múltipla ajustada por sexo, idade, IMC e GGT dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i> associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)	118
Tabela 53 - Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i> de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)	119
Tabela 54 - Descrição das frequências do alelo mutado de polimorfismos no gene <i>MTTP</i> identificados nas populações do presente estudo e no banco de dados de polimorfismo do NCBI	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
ALFA	<i>Allele frequency aggregator</i>
ALT	Alanina aminotransferase
ApoB	Apolipoproteína B
ApoC3	Apolipoproteína C 3
ApoE	Apolipoproteína E
APRI	<i>Aspartate aminotransferase to platelet ratio index</i>
AST	Aspartato aminotransferase
C	Citosina
CAP	<i>Controlled attenuation parameter</i> – Parâmetro de atenuação controlada
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
E	Ácido glutâmico
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i> - Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática
et al	E colaboradores
FIB-4	<i>Fibrosis-4 score</i>
G	Guanina
GCKR	<i>Glucokinase regulator</i>
GCLC	<i>Glutamate cysteine ligase catalytic subunit</i>
GGT	Gama glutamil transferase
H	Histidina
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	Antígeno leucocitário humano
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
HSD17B13	<i>17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 13</i>
I	Isoleucina
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IFNL3	Interferon lambda 3

IFNL4	Interferon lambda 4
IL28B	Interleucina 28 B
IMC	Índice de massa corporal
IMT/USP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
Kit	Conjunto de reagentes
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LIM-47	Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus
MAFLD	<i>Metabolic associated fatty liver disease</i> – Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo
MBOAT7	<i>Membrane bound o-acetyltransferase domain containing 7</i>
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i>
mg	Miligrama
min	Minuto/minutos
mL	Mililitro/mililitros
MRI-PDF	<i>Magnetic resonance imaging-proton density fat fraction</i>
mRNA	RNA mensageiro
MRS	Magnetic resonance spectroscopy – espectroscopia por ressonância magnética
MTTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i> – Proteína de transferência de triglicerídeo microsomal
n	Número de amostras
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
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
PDF	<i>Proton density fat fraction</i>
PEMT	<i>Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase</i>
pmol	Picomol
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain containing protein 3</i>
PPARalfa	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
Q	Glutamina
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> – Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RIBA	<i>Recombinant immunoblot assay</i> – Ensaio de imunotransferência recombinante
RM	Ressonância magnética
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

SES/SP	Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de nucleotídeo único
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
T	Timina
T	Treonina
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
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 codificante
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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Vírus da hepatite C	1
1.2 Epidemiologia da hepatite C	1
1.3 Transmissão da hepatite C	4
1.4 História natural da hepatite C	5
1.5 Diagnóstico da hepatite C	7
1.6 Tratamento da hepatite C	8
1.7 Manifestações extra-hepáticas na hepatite C	10
1.8 Esteatose hepática na hepatite C	11
1.9 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)	12
1.10 Proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP)	14
1.10.1 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)	15
1.10.2 Polimorfismos no gene <i>MTTP</i>	16
1.10.3 Polimorfismos no gene <i>MTTP</i> e a DHGNA	19
1.10.4 SNPs no gene <i>MTTP</i> e sua relação com a hepatite C	21
1.11 Justificativa	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MÉTODOS	27
3.1 Casuística	27
3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão para o presente estudo	28
3.1.2 Tamanho de amostra	29
3.1.3 Fluxograma de seleção dos indivíduos	31
3.2 Coleta de dados	32
3.2.1 Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV: Avaliação clínica, laboratorial e histológica	32
3.2.2 Grupo 2 - Indivíduos saudáveis: Dados demográficos	34
3.3 Detecção dos SNPs no gene <i>MTTP</i> para o Grupo 1 (portadores crônicos do HCV) e para o Grupo 2 (indivíduos saudáveis)	34
3.3.1 Extração do DNA	34
3.3.2 Genotipagem dos SNPs no gene <i>MTTP</i>	36
3.3.2.1 Padronização da PCR	36

3.3.2.1.1 <i>Primers</i>	37
3.3.2.1.2 Amplificação dos fragmentos do gene <i>MTTP</i>	38
3.3.2.1.3 Identificação do produto amplificado	40
3.3.2.2 Padronização da RFLP	41
3.3.2.2.1 Mapa de predição de endonuclease	41
3.3.2.2.2 Digestão enzimática	48
3.3.2.2.3 Identificação do produto digerido	49
3.4 Modelos genéticos	50
3.5 Análise estatística	50
3.6 Análise genética	51
3.6.1 Frequência gênica e genotípica	51
3.6.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	52
3.6.3 Desequilíbrio de Ligação	52
3.6.4 Teste de haplótipos	53
3.7 Aspectos éticos	53
4. RESULTADOS	55
4.1 Características gerais	55
4.2 Características associadas à esteatose hepática	58
4.3 Genotipagem dos polimorfismos -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene <i>MTTP</i>	61
4.4 Características genéticas dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i> nos portadores crônicos do HCV - Grupo 1	65
4.5 Características genéticas dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i> nos indivíduos saudáveis - Grupo 2	67
4.6 Comparação das características genéticas dos polimorfismos no gene <i>MTTP</i> entre os portadores crônicos do HCV (Grupo 1) e os indivíduos saudáveis (Grupo 2)	70
4.7 Características avaliadas em relação aos polimorfismos no gene <i>MTTP</i>	72
4.7.1 Características avaliadas em relação ao polimorfismo -493G/T	73
4.7.1.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo -493G/T	79
4.7.2 Características avaliadas em relação ao polimorfismo I128T	85
4.7.2.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo I128T	91
4.7.3 Características avaliadas em relação ao polimorfismo Q95H	97
4.7.3.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo Q95H	101
4.7.4 Características avaliadas em relação ao polimorfismo Q244E	106
4.7.4.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo Q244E	108
4.8 Análise de interação entre os polimorfismos no gene <i>MTTP</i> com a presença de esteatose	111

hepática em portadores crônicos do HCV	
4.9 Teste de associação dos polimorfismos na forma de haplótipos com a presença de esteatose hepática	112
4.10 Características associadas à resistência à insulina	113
4.11 Teste de associação dos polimorfismos na forma de haplótipos com a presença de resistência à insulina	118
4.12 Resumo dos principais achados	120
5. DISCUSSÃO	124
6. CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	141
ANEXOS	157

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é um agente infeccioso e foi identificado por Choo et al. em 1989. Esse vírus pode causar uma inflamação persistente no fígado, a hepatite C. O HCV está distribuído mundialmente, assim pessoas de diversos gêneros, raças e idades podem estar infectadas (Choo et al., 1989; Lavanchy, 2011; Hajarizadeh; Grebely; Dore, 2013; Lee et al., 2014; Spearman et al., 2019).

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae*. Esse vírus é composto por um capsídeo, um envelope proteico e uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) que possui sentido positivo. O RNA viral contém uma longa fase aberta de leitura (ORF) que é delimitada por regiões não traduzidas em proteínas nas suas extremidades, uma região 5'UTR (região não codificante) e uma região 3'UTR. A ORF possui de 9024 a 9111 nucleotídeos dependendo do genótipo que são codificados em um grande polipeptídeo. Após a tradução ribossômica da ORF, são produzidas proteínas estruturais divididas em E1, E2 e *core*, responsáveis pela proteína do envelope e pelo capsídeo. São produzidas também proteínas não estruturais divididas em p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, que atuam na replicação do HCV na célula do hospedeiro (Kim; Chang, 2013; Scheel; Rice, 2013). A região 5'UTR, por ser uma região mais conservada do genoma do HCV, geralmente pode ser escolhida para detecção do genoma desse vírus e também dos seus diversos genótipos (Li; Lo, 2015).

1.2 Epidemiologia da hepatite C

Estima-se que 1,5 milhão de novas infecções pelo HCV ocorram anualmente, e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 58 milhões de indivíduos são portadores da infecção crônica pelo HCV em todo o mundo. Anualmente, cerca de 290 mil indivíduos vão a óbito devido às complicações relacionadas à hepatite C crônica, sobretudo devido à cirrose ou ao hepatocarcinoma (HCC) (WHO, 2023).

A distribuição do HCV varia conforme a região geográfica. Regiões como o Mediterrâneo Oriental e Europa possuem uma maior concentração de pessoas cronicamente infectadas, seguido do Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental, África e Américas (WHO, 2023). Porém, em um estudo no qual foi proposto criar um modelo de análise para avaliar a prevalência de viremia pelo HCV no mundo todo, foi observado que 80% das infecções globais por HCV estão concentradas em 30 países. Nesse trabalho a prevalência global de HCV encontrada estimada foi de 1%, correspondendo a 71,1 milhão de infecções (Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017; Razavi, 2020).

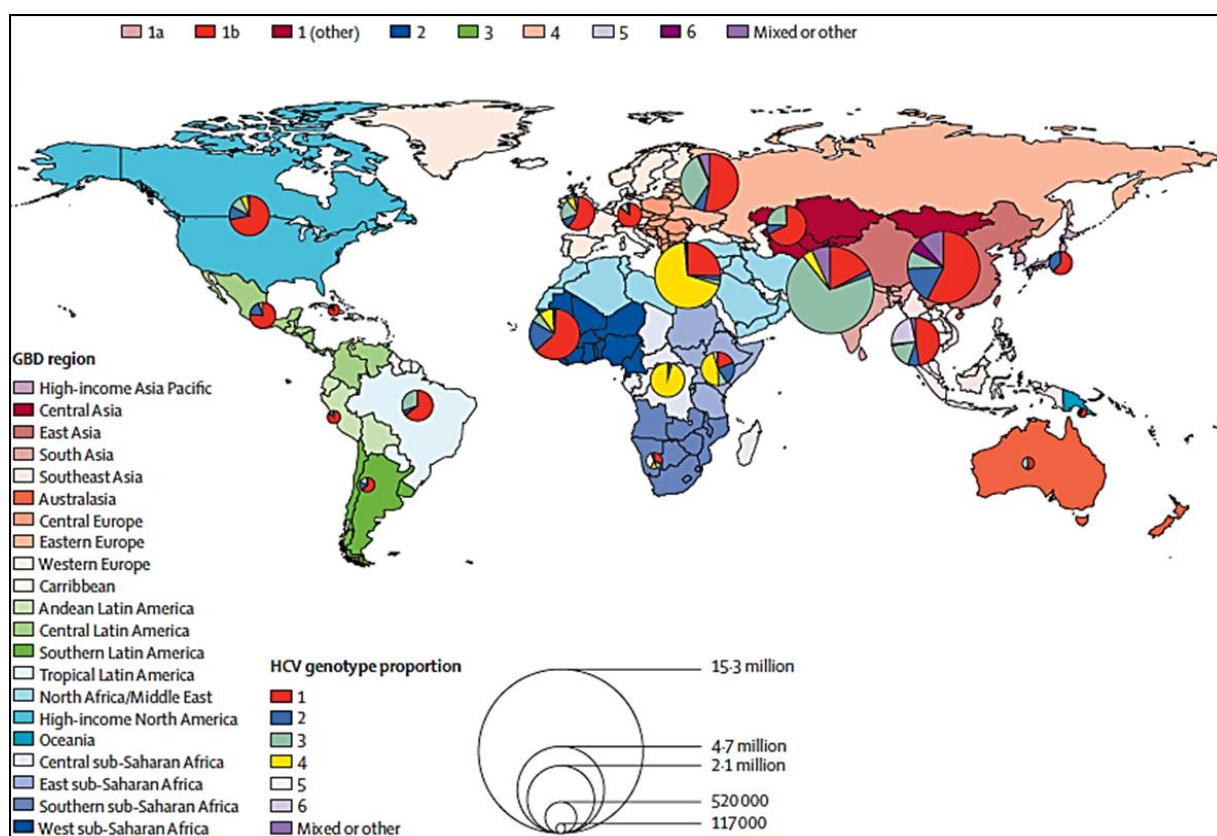
Hanus et al. (2015) relataram uma incidência de novos casos de hepatite C no Brasil de 6,7 por 100 mil habitantes entre os anos de 2001 e 2012. O estado brasileiro com maior taxa de novos casos foi o Rio Grande do Sul, seguido do Acre, Santa Catarina e São Paulo, enquanto o Piauí e o Pará apresentaram menores taxas. Foi observada uma predominância de novos casos em homens e na faixa etária entre 40 e 49 anos (Hanus et al., 2015). Aparentemente, a taxa de detecção de novos casos se manteve estável, pois, de acordo com o mais recente Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, no ano de 2022 a taxa de detecção de casos confirmados de hepatite C foi de 6,6 para cada 100 mil habitantes no Brasil. Notou-se uma taxa mais elevada na região Sul do país (12,4 casos por 100 mil habitantes), seguida da região Sudeste (8,5 casos por 100 mil habitantes), Centro-Oeste (4,7 casos por 100 mil habitantes), Norte (3,5 casos por 100 mil habitantes) e, por fim, Nordeste (2,2 casos por 100 mil habitantes). As capitais Porto Alegre, São Paulo, Curitiba, Rio Branco, Porto Velho, Goiânia, Florianópolis, Salvador, Manaus, Boa Vista e Aracaju, foram as que apresentaram taxas de detecção de hepatite C mais elevadas; todas essas apresentaram taxas superiores à taxa nacional (Brasil, 2023).

Sabe-se que o HCV apresenta uma grande diversidade genética. Esse vírus é classificado em oito genótipos, de 1 a 8, e seus subtipos. A descoberta mais recente foi do genótipo 8 em indivíduos indianos, confirmando a circulação desta linhagem na população humana. Os genótipos 1, 2, 3, 4 e 6 apresentam alta variabilidade genética e, desse modo, contêm vários subtipos; enquanto os genótipos 5, 7 e 8 apresentam 1 ou 2 subtipos identificados. Todos esses genótipos são determinados

como hepatotrópicos, apesar da divergência entre suas sequências de nucleotídeos (Gower et al., 2014; Borgia et al., 2018).

Ainda em relação aos genótipos do HCV, eles apresentam variação em sua distribuição geográfica (**Figura 1**) e também de acordo com a categoria de risco de transmissão (Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017; Guntipalli et al., 2021). Os genótipos e subtipos apresentam particularidades relacionadas à agressividade. Desse modo, com a ampla distribuição de genótipos pelo mundo, destaca-se a importância de utilizar terapias pangenotípicas para eliminação do HCV. Em nível global, o genótipo 1 é o mais prevalente, presente em cerca de 44% das infecções, e na sequência está o genótipo 3 (25% de todas as infecções) e o genótipo 4 (15% de todas as infecções). De modo geral, é observada uma maior prevalência do genótipo 1 em países com uma renda elevada, sendo o genótipo 3 mais prevalente em países de média renda e o genótipo 4 mais prevalente em países de baixa renda (Smith et al., 2014; Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017).

Figura 1 - Distribuição global de genótipos do HCV



Fonte: adaptado Polaris Observatory HCV Collaborators (2017).

1.3 Transmissão da hepatite C

A transmissão do vírus ocorre principalmente pela via parenteral. Além disso, a transmissão do HCV pode ocorrer por outros mecanismos igualmente relevantes, como o compartilhamento de agulhas e/ou seringas por usuários de drogas intravenosas, realização de tatuagens, inserção de *piercings* corporais, reutilização de equipamentos médicos ou odontológicos, realização de procedimentos invasivos como hemodiálise sem os devidos cuidados de biossegurança e praticar atividades sexuais de alto risco. Antes da década de 1990, em bancos de sangue não se realizava a triagem do anti-HCV, assim existem populações consideradas de alto risco como indivíduos que receberam transfusão sanguínea, imunoglobulinas anti-D no período gestacional ou hemoderivados durante esse período (Westbrook; Dusheiko, 2014; Spearman et al., 2019). Sabe-se que a transmissão da hepatite C não ocorre pelo leite materno, pelo contato casual (beijos e abraços) ou por partilhar bebida e comidas com uma pessoa infectada (WHO, 2023).

De acordo com o Boletim Epidemiológico sobre Hepatites Virais publicado pelo Ministério da Saúde, provavelmente a fonte ou mecanismo de infecção mais observado no Brasil foi o uso de drogas, representando 27,0% do total de casos; na sequência foi a transfusão sanguínea e a relação sexual, correspondendo a 22,3% e 22,0% respectivamente do total de casos. Nos casos relatados em 2022, a proporção de infecções por relação sexual foi 51,6% superior ao percentual de infecções associadas ao uso de drogas e por via transfusional (Brasil, 2023). Roudot-Thoraval relatou que na União Europeia o uso de drogas injetáveis entre jovens adultos é o mecanismo mais importante de infecção pelo HCV (Roudot-Thoraval, 2021). Uma recente revisão sistemática e meta-análise estimou uma prevalência de hepatite C de 57% em usuários de drogas injetáveis na América Latina e no Caribe (Magri et al., 2023). Embora a transmissão do HCV seja fortemente associada ao uso de drogas injetáveis, recentemente tem se discutido a transmissão por contato sexual principalmente envolvendo práticas sexuais de alto risco, múltiplos parceiros e em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Lloyd; Franco, 2023; Ferrufino et al., 2023).

Não existe vacina eficaz contra a hepatite C, desse modo, a prevenção depende da redução do risco de exposição ao vírus. O Ministério da Saúde

recomenda algumas ações para evitar a infecção: não compartilhar objetos que possam ter entrado em contato com sangue (alicates, agulhas, seringas, escova de dente etc.), utilizar preservativo durante as relações sexuais, realizar os exames pré-natal em gestantes e, quando o resultado for positivo, aderir às recomendações médicas (Brasil, 2023). A atenção com reinfecção pelo HCV também é necessária principalmente entre os usuários de drogas injetáveis, uma vez que as taxas de reinfecção nesse grupo são de quase 5% ao ano e geralmente são maiores em regiões com baixa cobertura de abordagens de redução de danos (Dore; Trooskin, 2020). Devido ao alto número de pessoas infectadas no mundo, a baixa taxa de testagem e ao acesso deficiente ao tratamento em vários países, o investimento em desenvolvimento de vacinas é uma necessidade de saúde pública, pois representa uma ferramenta importante para reduzir novas infecções pelo HCV (Scott et al., 2019; Manne et al., 2021).

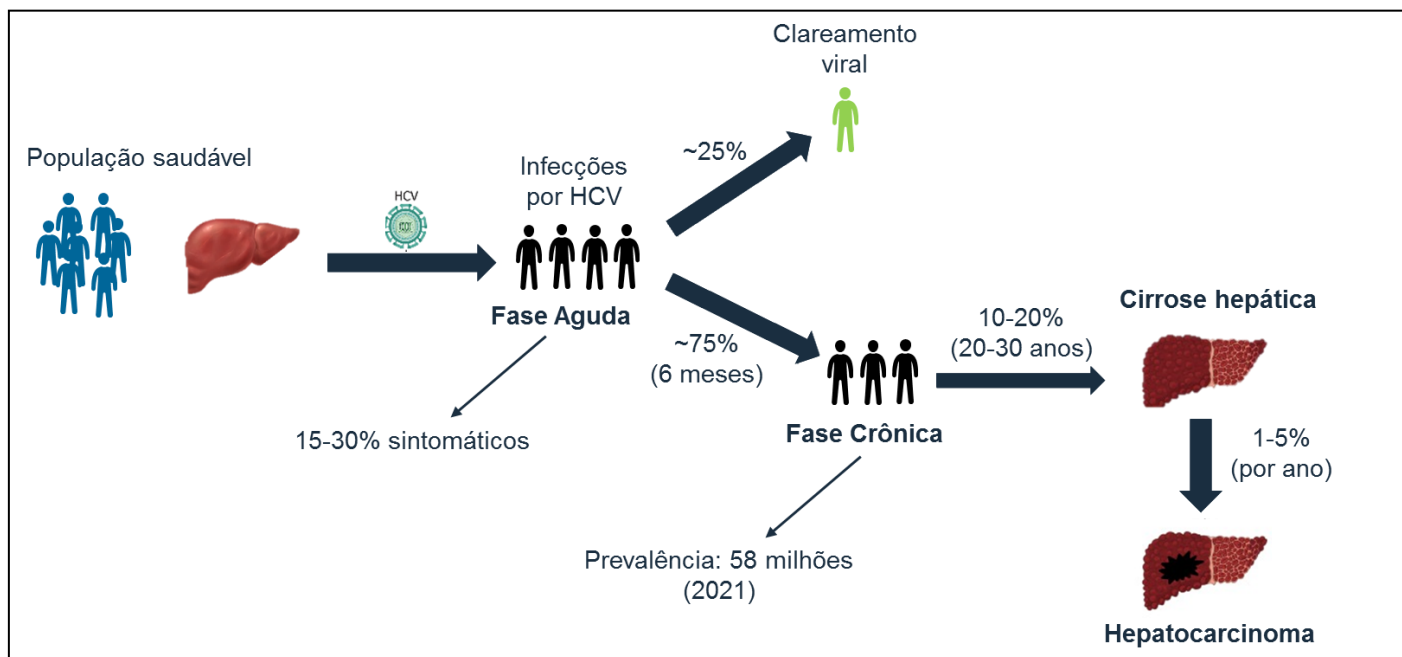
1.4 História natural da hepatite C

O curso clínico de infecção pelo HCV é muito variável entre os indivíduos. O período de incubação desse vírus pode variar de 2 semanas a 6 meses, seguido das fases aguda e crônica da infecção. Os primeiros seis meses após a infecção referem-se à fase aguda da doença. Geralmente essa fase apresenta evolução subclínica, pois pode ou não apresentar sintomas específicos das hepatites virais. Cerca de 15% a 30% dos indivíduos com infecção pelo HCV podem apresentar sintomas durante a fase aguda, sendo os sintomas leves e inespecíficos, como mialgia e letargia; a icterícia também pode ser observada. Aproximadamente 75% dos indivíduos infectados pelo HCV progridem para a fase crônica da doença (Hajarizadeh; Grebely; Dore, 2013; Spearman et al., 2019).

Já o clareamento espontâneo do vírus pode ocorrer em aproximadamente 25% dos indivíduos. O clareamento espontâneo é descrito como níveis indetectáveis de RNA do HCV e está associado ao sexo feminino, a presença de anticorpos neutralizantes, uma ampla resposta imune, e variações genéticas no hospedeiro, como polimorfismos no gene antígeno leucocitário humano (HLA) e no gene da interleucina 28 B (IL28B), também conhecido como interferon lambda 3 (*IFNL3*) e *IFNL4* (Hajarizadeh; Grebely; Dore, 2013; Duggal et al., 2013).

Após a persistência de RNA do HCV no sangue do paciente durante no mínimo seis meses, a infecção passa a ser crônica. Posteriormente a cronificação da doença, a chance de desenvolver cirrose é de 10% a 20% em cerca de 20 a 30 anos de infecção. Usualmente, com a cirrose já estabelecida, há um risco anual entre 1% e 5% de desenvolver HCC e entre 3% e 6% de ocorrer descompensação hepática (**Figura 2**). De acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde de 2023, a principal causa de óbitos entre as hepatites virais é a hepatite C. Além disso, em todas as regiões do Brasil, o número de mortes aumentou com o passar dos anos. Foram descritos 65.061 óbitos associados com a hepatite C, entre os anos de 2000 e 2021, e a hepatite C foi a causa básica de 52,2% (33.973) desses óbitos (Brasil, 2023). A progressão da doença para fibrose hepática e, conseqüentemente, cirrose e HCC está associada com diversos fatores: ambientais, virais e relacionados ao hospedeiro. A progressão da doença pode ser influenciada por algumas características demográficas, como gênero e idade. Foi observado que indivíduos mais jovens possuem uma lenta taxa de progressão quando comparados com a infecção em indivíduos mais velhos; além disso, homens são mais propensos a evoluir para cirrose hepática. Variações genéticas, como SNPs, também foram associadas com o desenvolvimento mais agressivo da doença. Em relação aos fatores metabólicos, obesidade, diabetes, resistência à insulina, e esteatose foram associados com a evolução da doença hepática (Seeff, 2009; Hajarizadeh; Grebely; Dore, 2013; Westbrook; Dusheiko, 2014).

Figura 2 - Esquema representativo da história natural da hepatite C



Fonte: elaborado pelo autor, baseado nos dados de Hajarizadeh; Grebely; Dore, 2013, Spearman et al., 2019 e WHO, 2023.

1.5 Diagnóstico da hepatite C

Recomenda-se que o diagnóstico laboratorial da hepatite C seja realizado com dois testes de diferentes metodologias. Os testes indiretos utilizados no diagnóstico se baseiam na detecção de anticorpo específico contra o HCV, o anti-HCV, como os ensaios imunoenzimáticos (ensaio imunoenzimático - EIA ou ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA). Frequentemente, utiliza-se o EIA de 3ª geração, o qual apresenta uma sensibilidade avaliada em 98,9% e uma especificidade em 100%. Como o anti-HCV reagente não diferencia uma infecção antiga de uma infecção atual, com a realização desse teste isoladamente não é possível diferenciar infecção ativa de infecção resolvida naturalmente. Desse modo, com o objetivo de finalizar o diagnóstico laboratorial adequado da hepatite C, indica-se que o anti-HCV positivo seja complementado por um teste que possibilite a detecção direta do HCV (Ansaldi et al., 2014; Li; Lo, 2015).

Para detectar e/ou quantificar o RNA do HCV circulante são usados os testes diretos (testes moleculares), capazes de determinar uma infecção ativa. A técnica de

transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é utilizada para detectar a presença de RNA do HCV através da amplificação do material genético do vírus. A técnica PCR em tempo real é usualmente utilizada para a quantificação do RNA, pois é capaz determinar número de cópias de genomas virais circulantes (carga viral). Ambos os testes, indiretos e diretos, são necessários para o diagnóstico e o acompanhamento da infecção pelo HCV (Li; Lo, 2015, Mukherjee et al., 2015).

Com o objetivo de ampliar o diagnóstico da hepatite C e, conseqüentemente, prevenir a progressão da doença e também a propagação do HCV, alguns grupos populacionais devem ser prioritariamente testados por apresentarem uma maior chance de exposição ao vírus, como indivíduos que possuem idade igual ou maior que 40 anos, indivíduos que receberam transfusão sanguínea ou hemoderivados anteriormente ao ano de 1993 ou transplantes em qualquer época, indivíduos vivendo com o HIV, indivíduos que usam álcool e/ou outras drogas, indivíduos que tenham diversos parceiros sexuais ou que apresentem diversas infecções sexualmente transmissíveis, indivíduos privados de liberdade, entre outros (Wilkins et al., 2015; Brasil, 2019).

1.6 Tratamento da hepatite C

O tratamento para a hepatite C tem como propósito a “cura”, ou seja, a erradicação do HCV quando se obtém a resposta virológica sustentada (RVS). A RVS é estabelecida como a negatificação do RNA viral utilizando métodos moleculares a partir da 12^a à 24^a semana após o fim do tratamento. A RVS está relacionada com a normalização das enzimas hepáticas, redução da incidência de complicações da doença hepática crônica, como cirrose, hipertensão portal e HCC e, por consequência uma melhora na qualidade e na expectativa de vida desses pacientes (Webster; Klenerman; Dusheiko, 2015; Brasil, 2019).

No final da década de 80, a administração de interferon (IFN) alfa por injeções subcutâneas foi um dos primeiros tratamentos para a hepatite C, pois possuía ação antiviral e influenciava na replicação do vírus. Posteriormente, a ribavirina foi adicionada ao tratamento juntamente com as formulações peguiladas do IFN alfa para melhorar as taxas de RVS. Assim, as taxas de RVS chegaram a

aproximadamente 50%, conforme o genótipo viral. Nos últimos anos, o tratamento da hepatite C progrediu notavelmente após o início da utilização dos antivirais de ação direta (DAAs) e do aumento da acessibilidade às terapias com DAAs livres de IFN. Esses antivirais agem diretamente sob o ciclo do vírus, sendo que os primeiros DAAs foram introduzidos na prática clínica no ano de 2011 (Webster; Klenerman; Dusheiko, 2015; Pawlotsky, 2016). Atualmente, há diversos esquemas terapêuticos com DAAs e, inclusive, regimes de tratamento pangênóticos, que possuem excelente eficácia antiviral e taxas de RVS maiores do que 90% na maior parte dos casos, mesmo em pacientes com pré-tratamentos sem sucesso com IFN (Dietz; Maasoumy, 2022).

No Brasil, o tratamento da hepatite C é recomendado a todos os pacientes com infecção pelo HCV, podendo apresentar a infecção aguda ou crônica, e independente do grau de fibrose hepática. Porém, realizar o estadiamento da fibrose ainda é muito importante, pois pode interferir na condução clínica do paciente e no esquema do tratamento que vai ser fornecido. Para avaliar o grau de fibrose hepática pode ser usado um dos diversos métodos disponíveis, como a biópsia hepática e a elastografia hepática, ou marcadores indiretos como o *aspartate aminotransferase to platelet ratio index* (APRI) e o *fibrosis-4 score* (FIB-4). O tratamento só não é recomendado para crianças com menos de três anos, pacientes oncológicos com cirrose Child-Pugh B ou C ou pacientes com expectativa de vida menor do que 12 meses, pacientes adultos que apresentam cirrose descompensada e que possuem recomendação para o transplante de fígado com o *model for end-stage liver disease* (MELD) *score* ≥ 20 , ainda não submetidos ao transplante hepático (Brasil, 2019).

Atualmente as terapias para hepatite C, integradas ao Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, possuem elevada efetividade e são os seguintes medicamentos: alfapeco-interferona 2a 180mcg; ribavirina 250mg; daclatasvir 30mg e 60mg; sofosbuvir 400mg; ledipasvir 90mg/sofosbuvir 400mg; elbasvir 50mg/grazoprevir 100mg; glecaprevir 100mg/pibrentasvir 40mg; velpatasvir 100mg /sofosbuvir 400mg; alfaepoetina 10.000 UI; filgrastim 300mcg. O uso dos DAAs tem como benefícios: menor tempo de tratamento, facilidade posológica, menor necessidade da realização de exames de biologia molecular rotineiramente, menos

efeitos adversos e elevadas taxas de RVS quando comparadas com os outros medicamentos disponíveis anteriormente (Brasil, 2019).

1.7 Manifestações extra-hepáticas na hepatite C

A qualidade de vida dos pacientes que evoluem para hepatite C crônica usualmente é pior do que a população em geral, pois a infecção crônica pelo HCV, além de causar um dano no fígado, é conhecida por ocasionar manifestações extra-hepáticas. Em geral, 15% a 35% dos pacientes com hepatite C crônica apresentam crioglobulinas circulantes e uma parte considerável desses podem desenvolver consequências clínicas, inclusive crioglobulinemia mista, neuropatia periférica, vasculite sistêmica, glomerulonefrite membranoproliferativa e doença de Raynaud. Os portadores crônicos do HCV também apresentam um risco maior de apresentar linfoma não-Hodgkin de células B. Ainda, pacientes com hepatite C crônica apresentam níveis significativamente mais baixos de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, e níveis mais altos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) quando comparados com pessoas não infectadas pelo vírus, indicando um perfil lipídico chamado de cardioprotetor. No entanto, os dados de vários estudos mostram uma associação entre a infecção pelo HCV e manifestações cardiovasculares, como doença arterial coronariana e aterosclerose (Westbrook; Dusheiko, 2014; Shiffman; Benhamou, 2015; Negro et al., 2015).

A infecção pelo HCV também tem sido descrita como uma das causas de doença renal. A insuficiência renal crônica apresenta diversos fatores de risco, como o envelhecimento precoce, a presença de diabetes, a hipertensão e a síndrome metabólica. A prevalência de uma taxa de filtração glomerular baixa entre os pacientes com hepatite C crônica varia de 5,1 a 17,2%, e a prevalência de insuficiência renal é de 4,8%. Outras características observadas em pacientes com hepatite C são: glomerulonefrite membranoproliferativa, nefropatia membranosa e lesão tubulointersticial. A erradicação do vírus pode impedir o desenvolvimento de diversas manifestações extra-hepáticas desta doença (Cacoub; Saadoun, 2021).

A síndrome metabólica é caracterizada por disglícemia, níveis baixos HDL, níveis elevados de triglicerídeos, pressão arterial elevada e obesidade. A hepatite C foi associada ao desenvolvimento de síndrome metabólica, e a sua prevalência é de

13,2% a 31,5% entre pacientes, sendo essa prevalência maior entre os indivíduos com mais de 60 anos. A presença de síndrome metabólica implica em uma doença mais grave e agressiva, pois é observada uma fibrose significativamente mais grave nesses pacientes. Nos pacientes com hepatites virais e doenças metabólicas concomitantes, o ideal seria uma abordagem multidisciplinar ao invés de apenas um tratamento antiviral (Wang; Cheng; Kao, 2020).

A hepatite C também está altamente associada ao desenvolvimento de resistência à insulina e de diabetes mellitus tipo 2. A resistência à insulina pode ser definida como uma falha das células sensíveis à insulina em responder à presença de insulina normalmente. É observada uma elevada prevalência de resistência à insulina nos pacientes que possuem hepatite C devido às proteínas do *core* do HCV desempenharem um papel patogênico neste processo. Essa prevalência é ainda maior entre os indivíduos com cirrose hepática quando comparado com os que possuem infecção crônica por HCV e não apresentam cirrose. Geralmente, a resistência à insulina pode levar a consequências clínicas, como progressão para diabetes mellitus tipo 2 e aumento do risco de doença cardiovascular em pacientes com hepatite C crônica (Oliveira et al., 2008; Adinolfi et al., 2016; Shawky et al., 2020).

1.8 Esteatose hepática na hepatite C

A esteatose hepática é considerada uma característica histológica na qual se apresenta um acúmulo excessivo de triglicerídeos nas células parenquimatosas do fígado, os hepatócitos. Esse acúmulo de triglicerídeos pode ocasionar uma lipotoxicidade das células, favorecendo o desenvolvimento de diversas comorbidades, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Além disso, a esteatose está presente em várias hepatopatias, podendo ser relacionada à toxicidade de drogas, sobrepeso, obesidade, alterações dos lipídeos (como colesterol ou triglicerídeos elevados), abuso de álcool, hepatites virais, dentre outros fatores (Negro, 2010; Stevenson; Utay, 2016).

Na hepatite C crônica, a esteatose hepática é observada em aproximadamente 40% a 80% dos pacientes. Características clínicas dos indivíduos

estão relacionadas com o seu desenvolvimento, como a ingestão de álcool, diabetes mellitus tipo 2, existência de sobrepeso ou obesidade, entre outras. Além disso, em pacientes infectados pelo genótipo 3 do HCV é observada uma maior ocorrência e maior gravidade da esteatose em comparação com os infectados pelo genótipo não 3. Desse modo, pode-se perceber que existe uma dependência genotípica da presença da esteatose em pacientes com hepatite C crônica (Rubbia-Brandt et al., 2004; Asselah et al., 2006; Negro, 2010; Adinolfi; Restivo; Marrone, 2013; Stevenson; Utay, 2016). Já em pacientes que possuem a coinfeção HIV/HCV essa prevalência é ainda maior quando comparada com os grupos de mono infectados. Presença de resistência à insulina relacionada com o HIV e/ou devido à terapia com antirretrovirais, aumento da inflamação sistêmica, obesidade, dislipidemia e estilo de vida sedentário são fatores que possivelmente podem contribuir para esse acúmulo de gordura no fígado (Stevenson; Utay, 2016).

Fatores do hospedeiro, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes como proteína de transferência de triglicerídeo microsomal (*MTTP*), *Transmembrane six superfamily member 2 (TM6SF2)* e *Patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3)* têm sido associados com uma predisposição à esteatose hepática em pacientes com a infecção pelo HCV (Perlemuter et al., 2002; Valenti et al., 2011; Adinolfi; Restivo; Marrone, 2013).

1.9 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Sabe-se que a DHGNA compreende um vasto espectro de distúrbios hepáticos, que são reconhecidos pelo acúmulo excessivo de triglicerídeos no fígado em ausência de consumo considerável de bebida alcoólica. A DHGNA está relacionada com uma ampla variedade de manifestações histológicas no fígado. Essas manifestações variam de esteatose simples, a qual acomete 5% ou mais dos hepatócitos, até quadros mais desfavoráveis como inflamação lobular, inflamação portal, balonização dos hepatócitos, fibrose e em último caso lesão hepática crônica (cirrose). Mais recentemente, foi sugerido o termo doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) como um termo abrangente mais adequado para DHGNA, pois representa uma manifestação hepática de um distúrbio multissistêmico (Adinolfi et al., 2016; Benedict; Zhang, 2017; Reccia et al., 2017;

Eslam; Sanyal; George, 2020). Essa nova nomenclatura foi aprovada em Junho/2023 por vários pesquisadores de diversas sociedades com foco em hepatologia e gastroenterologia (Rinella et al., 2023). A MAFLD provavelmente oferece a vantagem de identificar com mais precisão o risco de doença hepática progressiva, diabetes e doença renal crônica, aterosclerose, função pulmonar mais gravemente prejudicada, câncer de cólon, e eventos intra-hepáticos e extra-hepáticos (Lonardo et al., 2022).

Estima-se que a prevalência de DHGNA seja de aproximadamente 25% na população adulta em todo o mundo. Essa doença é altamente prevalente em todos os continentes. As taxas de prevalência mais altas foram relatadas na América do Sul (31%) e no Oriente Médio (32%), enquanto a prevalência mais baixa foi relatada na África (14%). A estimativa geral da prevalência EHNA diagnosticada por biópsia em pacientes com DHGNA foi de 59,10% (Younossi et al., 2016). Em uma fração atribuível da população com DHGNA foi observado um aumento significativo de HCC, apesar de se saber que a maioria dos casos de HCC é decorrente de hepatites virais, HCV e vírus da hepatite B (HBV). O HCC é um câncer associado a uma inflamação subjacente e, devido à epidemia global de obesidade, foi notado um crescimento geral na incidência de HCC e mortes relacionadas à DHGNA em todo o mundo (Kelley; Greten, 2021).

Os fatores de risco descritos como relacionados ao desenvolvimento da DHGNA são a presença de síndrome metabólica, de diabetes mellitus tipo 2, tabagismo, sedentarismo, idade, gênero e dieta (Benedict; Zhang, 2017). Algumas variantes genéticas em genes envolvidos no metabolismo celular de lipídeos no fígado foram definidas como os fatores de risco genéticos para DHGNA, como: *MTTP*, *TM6SF2*, *PNPLA3*, *Membrane bound O-acetyltransferase domain containing 7 (MBOAT7)*, *Glucokinase regulator (GCKR)*, *17-Beta hydroxysteroid dehydrogenase 13 (HSD17B13)*, *Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)*, *Apolipoproteína E (ApoE)*, *Apolipoproteína C 3 (ApoC3)*, *Nuclear receptor subfamily 1 group 1 member (NR1H2)* e *Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT)* (Adinolfi et al., 2016; Miyaaki; Nakao, 2017; Benedict; Zhang, 2017; Juanola et al., 2021). Além disso, fatores epigenéticos podem influenciar o desenvolvimento de DHGNA desde o embrião. Foi observado que obesidade materna, diabetes ou consumo de dieta ocidental ocasionam um

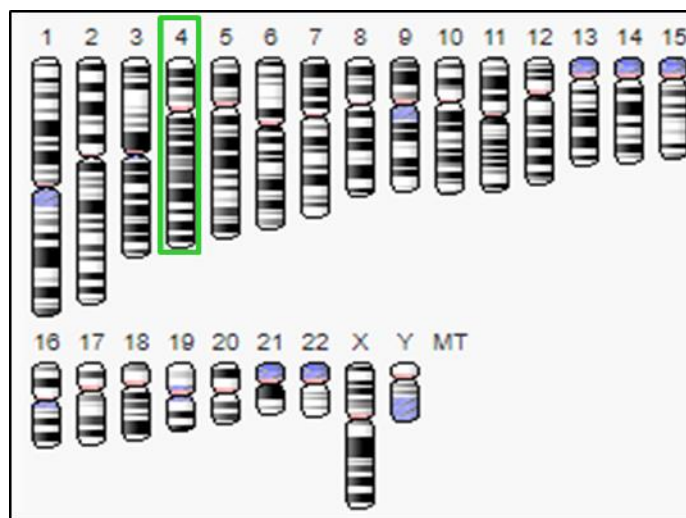
ambiente intrauterino desfavorável no qual a função mitocondrial hepática do feto é afetada ficando suscetível a danos (Baker; Friedman, 2018).

Na hepatite C crônica, foi descrita uma prevalência média de aproximadamente 55% da DHGNA, depende do genótipo do vírus e também da presença da síndrome metabólica, essa taxa é mais elevada do que a descrita na população geral. Diversos achados clínicos e experimentais revelaram que as proteínas do *core* do HCV podem causar acúmulo de gordura no fígado ao ativar o *Sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) 1 e 2, inibir a atividade da proteína MTTP e, assim, prejudicar a produção, excreção e absorção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Acredita-se que uma influência mútua entre o metabolismo de lipídeos do hospedeiro e o HCV seja fundamental para o estabelecimento do ciclo de vida do HCV. Portanto, a esteatose hepática pode ser utilizada como um marcador individual de pacientes que apresentam elevado risco de progressão da doença, desenvolvimento de manifestações extra-hepáticas e uma diminuição da taxa de resposta ao tratamento, possivelmente mesmo após a introdução dos medicamentos antivirais para hepatite C (Adinolfi et al., 2016).

1.10 Proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP)

A proteína MTTP é heterodimérica, de 97 kDa, frequentemente encontrada em grandes quantidades nos hepatócitos, enterócitos e miócitos. Essa proteína foi descrita por Wetterau e Zilversmit na década de 1980, os autores observaram que a proteína MTTP atuava na transferência de ésteres de colesterol e triglicerídeos (Wetterau; Zilversmit, 1984). A proteína MTTP é produzida a partir de um gene que carrega o mesmo nome, o gene *MTTP*. Esse gene está localizado no cromossomo 4 humano, localização 4q23 e possui 17 íntrons (**Figura 3**) (Shoulders et al., 1994; Rubin et al., 2008; Saad et al., 2014).

Figura 3 - Cromossomos humanos, evidenciando o cromossomo 4 no qual está localizado o gene *MTTP*



Fonte: adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=4547.

A proteína MTTP desempenha um importante papel na produção e secreção de lipoproteínas contendo Apolipoproteína B (ApoB), em especial triglicerídeos e VLDL. Variantes genéticas funcionais no gene *MTTP* podem influenciar a concentração ou a atividade da proteína MTTP, afetando os níveis de lipoproteínas e lipídeos plasmáticos e, portanto, contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose e de esteatose hepática (Zampino et al., 2008; Okumura et al., 2009; Pan et al., 2012).

1.10.1 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

Os SNPs são definidos como variações genéticas pontuais de um único nucleotídeo na sequência de alelos ao longo do ácido desoxirribonucleico (DNA). O alelo mutado pode apresentar uma frequência de 1% ou mais na população geral e sua transmissão ocorre dos pais para os filhos. Os SNPs são os tipos mais abundantes de variação da sequência de DNA no genoma humano (Orita et al., 1989; Brookes, 1999; Kwok; Gu, 1999; Fareed; Afzal, 2013).

Embora a maioria dessas variações genéticas não tenham sido relacionadas com sérias consequências biológicas, uma fração desses SNPs possuem um

significado funcional e servem de base para entender a diversidade encontrada entre os humanos. Os SNPs podem ser usados como marcadores genéticos para determinar padrões de herança e são instrumentos importantes para pesquisa de fatores genéticos relacionados com doenças humanas (Kwok; Chen, 2003).

1.10.2 Polimorfismos no gene *MTTP*

Os polimorfismos -400A/T e -493G/T localizados em uma região promotora do gene *MTTP* foram primeiramente descritos por Karpe et al. (1998). Nesse estudo foram incluídos homens saudáveis com idade entre 30 e 45 anos residentes em Estocolmo, Suécia. A presença de dois alelos mutados (TT) para o SNP -493G/T foi associada com níveis mais baixos de triglicerídeos e de LDL no plasma quando comparado aos indivíduos heterozigotos (GT) e homozigotos selvagens (GG). Entretanto, não foi encontrada uma diferença na concentração de VLDL e de HDL entre esses indivíduos. Para o SNP -400A/T no gene *MTTP*, não foram observadas alterações significativas entre os níveis de lipídeos avaliados. Os dados descritos nesse artigo sugerem que os polimorfismos no gene *MTTP* parecem influenciar a concentração de lipídeos nos indivíduos saudáveis (Karpe et al., 1998).

Alguns estudos investigaram a associação de SNPs no gene *MTTP* com alterações nos níveis de lipídeos plasmáticos (Talmud et al., 2000, Ledmyr et al., 2002, Wolff et al., 2011; Pan et al., 2012; di Giuseppe et al., 2013). A influência de sete diferentes SNPs nos níveis de lipoproteínas e lipídeos em 564 indivíduos de meia idade foi observada por Ledmyr et al. (2002). Os sete SNPs estudados, localizados no gene *MTTP*, foram -493G/T, -164T/C, -400A/T, H297Q, Q244E, Q95H e I128T. A presença do alelo mutado nos polimorfismos -164T/C, -493G/T e I128T influenciou significativamente a diminuição dos níveis de ApoB e LDL. Os mesmos indivíduos portadores do genótipo homozigoto mutado para esses SNPs apresentaram maiores medidas de circunferência abdominal, maiores índices de massa corporal (IMC) e elevação no nível de insulina. Desse modo, o estudo concluiu que SNPs no gene *MTTP* apresentam a capacidade de implicar em um aumento de risco para doenças cardiovasculares (Ledmyr et al., 2002).

Na pesquisa de Pan et al. (2012), foram avaliadas a relação dos perfis lipídicos e o SNP -493G/T em populações chinesas de diferentes regiões

demográficas. Nesse estudo, portadores de ambos os alelos mutados (TT) apresentaram níveis séricos mais baixos de LDL e de triglicerídeos. Desse modo, o SNP -493G/T no gene *MTTP* pode desempenhar um papel importante na produção de lipídeos, especialmente na população Bama, localizada no noroeste da China (Pan et al., 2012).

Em outro estudo, a presença de alelos mutados em dois SNPs no gene *MTTP* (H297Q e -493G/T) foi associada a um nível significativamente maior de ApoB quando comparada com os outros grupos de genótipos combinados. Níveis elevados de ApoB foram observados em indivíduos que carregavam o genótipo homocigoto mutado (QQ) para o SNP H297Q com altos níveis de triglicerídeos ou em combinação com o alelo mutado (T) do SNP -493G/T. Os autores concluíram que em homens saudáveis, os polimorfismos no gene *MTTP* são capazes de modular a produção e a secreção de ApoB (Talmud et al., 2000). Diversos estudos avaliaram a relação de diferentes SNPs no gene *MTTP* com distintas patologias, como hipobetalipoproteinemia, diabetes tipo 2, EHNA, síndrome metabólica e doença arterial coronariana (Lancellotti et al., 2004; Phillips et al., 2004; Gambino et al., 2007; Liou et al., 2013; Klevstig et al., 2019). Na **Tabela 1** estão relatados alguns estudos que analisaram a influência de SNPs no gene *MTTP* em várias patologias.

Tabela 1 - Descrição dos estudos de associação de polimorfismos no gene *MTTP* com diversas patologias

Estudo	SNPs gene <i>MTTP</i>	População	Tipo de análise estatística	Principais achados
Phillips et al., 2004	-400A/T -493G/T -164T/C	Pacientes com Diabetes tipo 2	Análise bivariada	O SNP -493G/T foi associado com uma diminuição do LDL e do VLDL
Wolff et al., 2011	-493G/T	Mulheres adultas sob diferentes dietas	Análise bivariada	O SNP -493G/T foi associado com o nível de absorção de colesterol
di Giuseppe et al., 2013	-164T/C I128T	Pacientes que apresentaram infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico	Análise bivariada e multivariada	O SNP -164T/C foi associado com uma diminuição do colesterol total e um aumento do risco de doenças cardiovasculares
Liou et al., 2013	-400A/T -493G/T Asp98Glu Gly151Gly Ser166Asn Cys174Cys Gln297His (H297Q)	Pacientes diagnosticados com esquizofrenia	Análise bivariada e multivariada	O SNP -493G/T foi associado com um aumento do risco de desenvolver síndrome metabólica
Klevstig et al., 2019	-164T/C	Pacientes com suspeita de doença arterial coronariana	Análise bivariada e multivariada	O SNP -164T/C foi associado com a disfunção cardíaca durante isquemia

Além dos SNPs no gene *MTTP* exercerem sua influência sobre os níveis de colesterol total e frações, é possível observar que existe, também, uma relação dos polimorfismos nesse gene com os níveis de insulina. Zák et al. (2008) avaliaram o efeito do polimorfismo -493G/T em 143 homens e 127 mulheres, sendo que 50 homens e 36 mulheres apresentavam síndrome metabólica. Um achado relevante desse trabalho foi a relação do polimorfismo -493G/T com vários parâmetros metabólicos em indivíduos com síndrome metabólica. Em homens diagnosticados com síndrome metabólica, a presença do alelo mutado (T) do SNP -493G/T foi associada com elevação dos níveis de insulina, colesterol total, triglicerídeos, VLDL, e um aumento do índice HOMA. A partir desses achados, observa-se que diversos fatores podem influenciar a síndrome metabólica, como fatores genéticos,

metabólicos e específicos do gênero (Zák et al., 2008). Em outro trabalho, a presença do alelo mutado (T) do SNP I128T no gene *MTTP* foi considerada um fator de proteção para a tolerância à glicose prejudicada, para o diabetes mellitus tipo 2 e também alguns outros parâmetros referentes à síndrome metabólica (Rubin et al., 2006). Os resultados apresentados em ambos os estudos indicam que a relação de SNPs no gene *MTTP* com os níveis de insulina, o desenvolvimento de resistência à insulina e consequentemente diabetes devem ser melhor investigadas, uma vez que o fígado é considerado o local de produção e armazenamento de glicogênio, da gliconeogênese e também da degradação de insulina.

1.10.3 Polimorfismos no gene *MTTP* e a DHGNA

A DHGNA é uma doença hepática na qual se destaca o excessivo acúmulo de triglicerídeos e tem uma alta prevalência em todo o mundo. Identificar variações genéticas que predispõem a essa doença poderia auxiliar identificar os indivíduos que estão em risco de desenvolver EHNA, que representa sua forma inflamatória, e colaborar na prevenção dessa doença. Hashemi et al. (2011) conduziram um estudo caso-controle com 83 pacientes iranianos diagnosticados com DHGNA e 93 indivíduos saudáveis, e avaliaram se havia associação dos polimorfismos Q95H e I128T, localizados no gene *MTTP*, e a presença de DHGNA. Não foi observada associação entre o SNP Q95H e a DHGNA. Entretanto, os indivíduos IT (heterozigotos) e os TT (homozigotos mutados) para o SNP I128T mostraram uma maior susceptibilidade para desenvolver a DHGNA quando em comparação com os indivíduos II (homozigotos selvagens), ou seja, a presença de um alelo mutado desse SNP pode influenciar o desenvolvimento de DHGNA nessa população (Hashemi et al., 2011).

Em uma recente meta-análise realizada para determinar a correlação entre o desenvolvimento da DHGNA e os SNPs I128T (rs3816873) e -493G/T (rs1800591) ambos no gene *MTTP*, não foi observada relação significativa entre os dois polimorfismos e a presença de DHGNA. Entretanto, a presença do alelo G do SNP -493G/T no gene *MTTP* foi associada significativamente com um aumento de risco de desenvolver EHNA a partir dos 10 trabalhos selecionados e incluídos nessa revisão com populações de diferentes etnias (Tan et al., 2020).

Um estudo conduzido na China avaliou em 580 pacientes diagnosticados com DHGNA e em 580 indivíduos saudáveis a relação de sete diferentes SNPs no gene *MTTP* e o desenvolvimento de DHGNA. Foi observada maior incidência de diversos fatores de risco para a presença de síndrome metabólica, como aumento de triglicérides, LDL, IMC, hipertensão arterial e diminuição de HDL em pacientes com a DHGNA. Após a realização da análise multivariada, foi observada associação do polimorfismo -164T/C (rs1800804) no gene *MTTP* com o aumento do risco de apresentar DHGNA; entretanto, outros polimorfismos (rs3805335 e rs1057613) foram associados com uma diminuição do risco para a DHGNA nessa população. Os SNPs I128T (rs3816873) e -493G/T (rs1800591) não apresentaram associação com a DHGNA. Os autores concluíram que algumas variantes genéticas no gene *MTTP* foram associadas com o desenvolvimento de DHGNA (Peng et al., 2014).

Em um estudo brasileiro com 131 pacientes com DHGNA e 141 voluntários saudáveis foram avaliadas a associação de dois diferentes polimorfismos nos genes *glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)* e *MTTP* com a presença de esteatose simples e EHNA. Os pacientes com EHNA foram associados com níveis elevados de insulina, GGT, AST, idade avançada, presença de diabetes e HOMA-IR (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) $\geq 2,5$ quando comparados com os pacientes que apresentavam somente esteatose simples. Em relação à influência dos polimorfismos, a presença do alelo mutado para no SNP -129C/T do gene *GCLC* foi associada significativamente com EHNA, enquanto que o SNP -493G/T do gene *MTTP* não apresentou nenhuma associação nessa população estudada (Oliveira et al., 2010). Na **Tabela 2** estão apresentados alguns estudos que avaliaram a associação de SNPs no gene *MTTP* em pacientes com DHGNA e seus espectros de distúrbios hepáticos.

Tabela 2 - Descrição dos estudos de associação de polimorfismos no gene *MTTP* com a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Estudo	SNPs gene <i>MTTP</i>	População	Tipo de análise estatística	Principais achados
Gambino et al., 2007	-493G/T	Pacientes com EHNA	Análise bivariada e multivariada	O SNP -493G/T influencia significativamente a doença hepática e o metabolismo lipídico pós-prandial em pacientes com EHNA
Oliveira et al., 2010	-493G/T	Pacientes com DHGNA	Análise bivariada e multivariada	O SNP -493G/T não apresentou associação na população estudada
Hashemi et al., 2011	I128T Q95H	Pacientes com DHGNA	Não apresentado	O SNP I128T foi associado com um aumento da susceptibilidade para DHGNA
Peng et al., 2014	-164T/C (rs1800804) -493G/T (rs1800591) I128T (rs3816873) rs1057613 rs13105033 rs3805335 rs982424	Pacientes com DHGNA	Análise bivariada e multivariada	O SNP -164T/C foi associado com um aumento do risco para DHGNA; os SNPs rs1057613 e rs3805335 foram associados com uma diminuição do risco para DHGNA
Dai et al., 2017	rs2306986	Crianças obesas com e sem DHGNA	Análise bivariada e multivariada	O SNP avaliado foi associado com suscetibilidade à DHGNA em crianças obesas

1.10.4 SNPs no gene *MTTP* e sua relação com a hepatite C

Apesar da hepatite C ser uma doença causada por um agente infeccioso, fatores epigenéticos e genéticos podem influenciar a sua evolução. A relação entre o HCV e a *MTTP* é complexa, pois na sua fase inicial a proteína *MTTP* exerce um papel na produção e secreção do HCV. Enquanto que na sua fase crônica pode ocorrer uma regulação negativa da proteína *MTTP* podendo gerar uma alteração na secreção de triglicerídeos e o acúmulo exagerado de lipídeos no fígado. Ainda, o alelo T (mutado) do SNP -493G/T no gene *MTTP* pode implicar em uma diminuição

dos níveis de mRNA da *MTTP*, e essa diminuição pode ser decorrente de algumas proteínas do HCV ou de supressores do *MTTP*. Isso ocasiona um aumento da lipogênese e, conseqüentemente, graus mais elevados de esteatose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV (Mirandola et al., 2010).

Dois estudos realizados em centros europeus avaliaram o papel patogênico do SNP -493G/T localizado no gene *MTTP* no desenvolvimento de esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica. Ambos encontraram uma associação entre o alelo mutado (T) do SNP -493G/T com a progressão da esteatose nessa população de portadores crônicos do HCV. Trata-se de uma contribuição importante para explicar o acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos (Zampino et al., 2008; Mirandola et al., 2009).

Um dos estudos mencionados avaliou 298 pacientes com infecção crônica pelo HCV e foi observado que pacientes com graus mais avançados de esteatose apresentavam maior IMC, idade mais avançada, infecção pelo genótipo 3 do HCV e a presença do alelo T (mutado) do SNP -493G/T, e todos esses foram considerados fatores de risco independentes para o desenvolvimento da esteatose. Posteriormente, os pacientes foram divididos em dois grupos, pacientes com infecção pelo genótipo 3 do HCV e pacientes com infecção pelo genótipo não-3 do HCV. Os autores observaram que o alelo mutado do SNP -493G/T contribuiu para o acúmulo de gordura hepática em ambos os grupos (com infecção pelo genótipo 3 e pelo genótipo não-3) (Mirandola et al., 2009). Em outro estudo, conduzido por Zampino et al. (2008), os autores avaliaram 102 pacientes e, dentre seus resultados destaca-se, na análise multivariada, que pacientes com infecção pelo genótipo 3 do HCV e que carregavam o alelo mutado do SNP -493G/T tinham maiores graus de esteatose, fibrose hepática, e carga viral elevada quando comparados com os homozigotos selvagens (GG). Independente do genótipo do SNP no *MTTP*, quando foi analisada a distribuição dos pacientes com infecção pelo genótipo 3 do HCV foi observado que apresentavam níveis mais baixos de colesterol, ApoB, HDL e LDL (Zampino et al., 2008).

Interessantemente, existem pacientes com hepatite C que apresentam uma progressão mais rápida para fibrose hepática quando comparados com outros pacientes, sem considerar a duração da doença, e polimorfismos genéticos que podem influenciar nessa progressão. Richardson et al. (2005) avaliaram a relação de

diversos SNPs em oito diferentes genes com a progressão mais acelerada para fibrose hepática e foi observada uma associação significativa entre SNPs localizados em seis dos oitos genes avaliados. O SNP -493G/T do gene *MTTP* foi associado com a progressão da fibrose em pacientes com hepatite C crônica. Avaliar essa abordagem pode permitir determinar um perfil genético preditivo de rápida progressão da doença, justificando um manejo terapêutico mais agressivo (Richardson et al., 2005).

Por outro lado, um trabalho que incluiu 86 pacientes franceses com infecção crônica pelo HCV observou que o SNP -493G/T não foi associado com a esteatose e fibrose. Destacou-se que a esteatose estava presente em 45,3% dos pacientes, e foi observada uma associação significativa entre o IMC e o aumento do grau de esteatose hepática (Petit et al., 2006).

Akgöllü e Akkız, em 2019 avaliaram a relação do SNP -493G/T com a esteatose em uma população turca com infecção pelo genótipo 1 do HCV. Apesar de encontrarem uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de triglicerídeos, colesterol total, LDL, VLDL e os pacientes com esteatose, o polimorfismo estudado não foi associado com a presença de esteatose em indivíduos que possuem a infecção pelo genótipo 1 do HCV (Akgöllü; Akkız, 2019). Em um estudo conduzido em São Paulo com 236 pacientes com hepatite C crônica, foi avaliada a influência dos polimorfismos -400A/T, -164T/C e H297Q localizados no gene *MTTP* na presença da esteatose hepática. O alelo mutado (C) do SNP -164T/C em conjunto com alterações nos níveis de GGT foi significativamente associado com a esteatose hepática. Além disso, foi observado uma associação estatisticamente significativa entre os alelos mutados para os polimorfismos -164T/C e -400A/T juntamente com a infecção pelo genótipo 3 do HCV e a ocorrência de esteatose nesses pacientes. Desse modo, sugere-se que a combinação de fatores hospedeiros e fatores virais podem potencialmente ser utilizados para prever a esteatose hepática (Prata et al., 2019a). Na **Tabela 3** estão apresentados alguns estudos que avaliaram a influência de polimorfismos no gene *MTTP* em pacientes com hepatite C.

Tabela 3 - Descrição dos estudos de associação de polimorfismos no gene *MTTP* com a hepatite C

Estudo	SNPs gene <i>MTTP</i>	População	Tipo de análise estatística	Principais achados
Petit et al., 2006	-493G/T	Pacientes com hepatite C crônica	Análise bivariada	O SNP -493G/T não foi associado com esteatose e fibrose
Zampino et al., 2008	-493G/T	Pacientes com hepatite C crônica	Análise bivariada e multivariada	O SNP -493G/T foi associado com esteatose, fibrose e carga viral
Mirandola et al., 2009	-493G/T	Pacientes com hepatite C	Análise bivariada	O SNP -493G/T foi associado com um aumento do risco para esteatose
Cai et al., 2011	-164T/C -493G/T -400A/T	Pacientes com hepatite C crônica	Análise bivariada e multivariada	O SNP -493G/T foi associado com a presença de esteatose em pacientes sem a infecção pelo genótipo 3 O SNP -400A/T foi associado com a presença de esteatose em pacientes com a infecção pelo genótipo 3
Siqueira et al., 2012	-493G/T	Pacientes com hepatite C crônica	Análise bivariada e multivariada	O SNP -493G/T (alelo G) foi considerado um fator de proteção para a esteatose
Prata et al., 2019a	-164T/C -400A/T H297Q	Pacientes com hepatite C crônica	Análise bivariada e multivariada	Os SNPs -164T/C e -400A/T foram associados com a esteatose entre os pacientes com a infecção pelo genótipo 3

1.11 Justificativa

Atualmente, ainda não está clara a relação entre os SNPs no gene *MTTP* e a susceptibilidade para resistência à insulina e esteatose hepática em portadores crônicos do HCV. Sabe-se que a esteatose está presente em grande parte desses pacientes e, além disso, pode ter um impacto significativo no avanço da doença hepática associada ao HCV. Diversos autores descrevem que fatores genéticos no

gene *MTTP* podem afetar os níveis de lipoproteínas e lipídeos, e que o HCV e a *MTTP* possuem uma relação complexa podendo levar ao acúmulo excessivo de lipídeos no fígado, contribuindo assim para o desenvolvimento da esteatose hepática. Diante do exposto e como ainda não estão bem estabelecidas essas associações, consideramos relevante realizar um estudo de caráter exploratório e contribuir para o melhor entendimento das bases genéticas relacionadas a essa doença.

Portanto, foram selecionados os SNPs -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* para avaliar suas características genéticas e investigar se apresentam influência nos níveis de lipídeos, esteatose hepática e resistência à insulina. Além disso, identificar se estes polimorfismos analisados em conjunto com outros polimorfismos (-164T/C, -400A/T e H297Q) no mesmo gene poderiam ser marcadores para identificação precoce da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV. Finalmente, em vista da ausência de dados disponíveis na literatura científica, conhecer pela primeira vez a frequência dos SNPs -164T/C, -400A/T, -493G/T, I128T, Q95H, Q244E e H297Q no gene *MTTP* em indivíduos saudáveis do Brasil, que diferentemente da maioria dos países possui uma população em sua composição étnica miscigenada.

Almejamos que, no futuro, o uso de testes genéticos para identificar a presença de diferentes polimorfismos poderá ser realizado de forma precoce e ajudará a definir subgrupos de pacientes com maior risco para o desenvolvimento da esteatose hepática, que poderão se beneficiar de medidas para tentar diminuir a sua progressão de forma preventiva ou terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (*MTTP*) em portadores crônicos do HCV e se há associação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática.

2.2 Objetivos específicos

Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV

- Padronizar ensaios de genotipagem tendo como alvo a detecção dos SNPs no gene *MTTP*.
- Avaliar as características genéticas dos SNPs -493G/T, I128T, Q95H e Q244E.
- Avaliar se as características do hospedeiro e do vírus em conjunto com o genótipo dos SNPs -493G/T, I128T, Q95H e Q244E influenciam a presença de esteatose hepática.
- Avaliar se, em conjunto, os genótipos dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* influenciam a presença de esteatose hepática.
- Avaliar a associação entre os SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E e a resistência à insulina.

Grupo 2 - Indivíduos saudáveis

- Realizar a genotipagem dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP*.
- Determinar a frequência e avaliar as características genéticas dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E em indivíduos saudáveis, e comparar suas distribuições com a encontrada nos portadores crônicos do HCV.

3. MÉTODOS

O estudo foi composto por dois grupos: o material do Grupo 1 (portadores crônicos do HCV) foi inicialmente coletado para o projeto de pesquisa intitulado “Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal” (Parecer CAPPesq nº 0914/09), e o material do Grupo 2 (indivíduos saudáveis) foi inicialmente coletado para o projeto de pesquisa intitulado “Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil” (Parecer CAPPesq nº 0283/07).

3.1 Casuística

Foram utilizadas amostras biológicas e dados coletados para os projetos de pesquisa citados acima. Segue uma breve descrição dos dois estudos fonte do material para a presente pesquisa, e uma descrição com mais detalhes da atual investigação.

Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal

O estudo teve como objetivo avaliar a frequência das manifestações extra-hepáticas (como artralgia, artrite, mialgia, parestesia, prurido, púrpura, diabetes, resistência à insulina, hipotireoidismo, crioglobulinemia, trombocitopenia autoimune, artrite reumatoide, líquen plano, psoríase, vasculite e síndrome de Sjogren), clínicas e laboratoriais associadas à hepatite C crônica em pacientes atendidos em um serviço de referência para atendimento de hepatites virais pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (SES/SP), o 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). Os participantes do estudo realizaram uma consulta médica e entrevista. Seguida de uma coleta de 10 ml de sangue no período de 2010 a 2012, este foi armazenado em freezer -80°C no Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus (LIM-47). Em consulta médica e entrevista foram investigados dados demográficos e antropométricos, hábitos, exames laboratoriais, fatores de risco para aquisição do HCV, nível sérico de RNA do HCV, genótipo viral.

Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil

Trata-se de um inquérito de base populacional conduzido com o objetivo de estimar a prevalência das hepatites virais A, B e C nas capitais das cinco grandes regiões brasileiras (Nordeste, Norte, Centro Oeste, Sudeste, Sul) e no Distrito Federal, além de identificar grupos de riscos segundo variáveis epidemiológicas, socioeconômicas e biológicas, entre 2005 e 2009. Entrevistas e amostras de sangue foram obtidas por meio de visitas em domicílios. A amostra foi selecionada por meio de amostragem estratificada por conglomerados em vários estágios e foi sorteada com igual probabilidade de cada domínio de estudo (região e faixa etária) (Ximenes et al., 2010). Em todo o país, foram selecionados 19.503 indivíduos de 10 a 69 anos (Pereira et al., 2013). O número de participantes incluídos com coletas de sangue no município de São Paulo foi de 2.232 e eram residentes em diferentes bairros. Atualmente, as amostras da capital paulista estão armazenadas em freezer -20°C no Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT/USP).

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão para o presente estudo

Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV

No presente estudo, a seleção dos portadores crônicos do HCV foi realizada com os mesmos critérios de seleção utilizados no estudo “Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal”.

Critérios de inclusão:

- Paciente atendido no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP.
- Idade mínima de 18 anos.
- Portador crônico do HCV - presença anti-HCV pesquisado por ELISA e presença de RNA-HCV detectado pela PCR por mais de seis meses.
- Portador crônico do HCV sem tratamento prévio para hepatite C.
- Estudo anatomopatológico de fragmento hepático feito nos últimos três anos, tendo como referência a data de coleta dos dados.

- Amostra de soro disponível.

Critérios de exclusão:

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

Grupo 2 - Indivíduos saudáveis

O estudo fonte denominado “Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil” teve como critérios: incluir indivíduos de 5 a 69 anos residentes em domicílios particulares nas 26 capitais do Brasil e no Distrito Federal durante a realização da pesquisa. No presente estudo, a seleção dos indivíduos saudáveis foi realizada com os critérios de seleção descritos abaixo.

Critérios de inclusão:

- Morador da região urbana do município de São Paulo.
- Ausência de infecção pelo HCV - não apresentar anticorpo anti-HCV pesquisado por ELISA.
- Idade mínima de 18 anos.
- Amostra de soro disponível.

Critérios de exclusão:

- Infecção ativa pelo HBV - presença de HBsAg, pesquisado por ELISA.

3.1.2 Tamanho de amostra

Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV

Foi realizado o cálculo do tamanho de amostra mínima necessária considerando os parâmetros descritos a seguir: erro alfa de 5%, erro beta de 20% e, então, um poder de 80%, erro padrão de 2. Empregou-se a equação recomendada para esse tipo de estudo: $n = \pi (1 - \pi) / e^2$, onde n = tamanho da amostra (mínimo requerido), π = proporção de interesse, e = erro padrão (Kirkwood; Sterne, 2006).

Esse cálculo foi realizado levando em consideração a frequência encontrada do homozigoto mutado (TT) para o SNP -493G/T no gene *MTTP* em portadores crônicos do HCV, pois esse é o SNP mais descrito na literatura. Para o cálculo considerou-se como referencial os dados descritos por Mirandola et al. (2009), onde foi encontrada uma frequência de 27,5% do alelo recessivo (T) para o SNP -493G/T do gene *MTTP* nos portadores crônicos do HCV. O tamanho de amostra mínima foi calculado em 225 portadores crônicos do HCV.

Dos 243 pacientes incluídos no estudo “Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal”, 236 portadores crônicos do HCV foram selecionados, pois esses participantes possuíam dados completos para o presente estudo e representavam um número maior de portadores crônicos do HCV em relação ao cálculo amostral. Nas amostras de soro foram realizadas a genotipagem dos SNPs I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP*.

Nota: os SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q e -493G/T foram previamente genotipados nesse grupo (Magri et al., 2017; Prata et al., 2019a, Prata, 2019b). No presente estudo esses dados foram submetidos a novas análises estatísticas e genéticas.

Grupo 2 - Indivíduos saudáveis

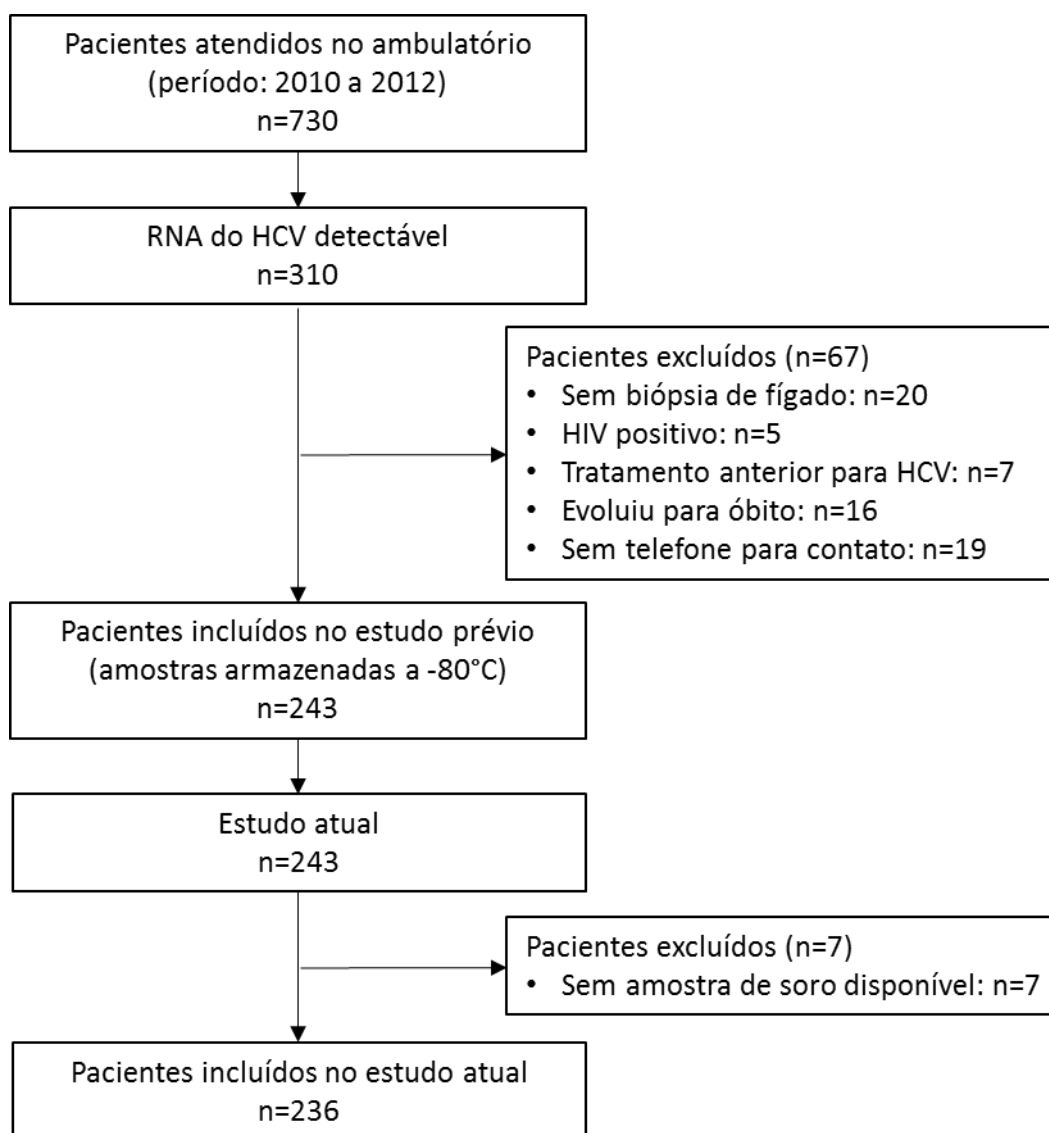
Foi realizado um cálculo para determinar tamanho de amostra mínima necessária. Foi utilizado como referencial os dados de Oliveira et al. (2010), no qual foi encontrada uma frequência de 19,4% do alelo recessivo (T) para o SNP -493G/T do gene *MTTP* em indivíduos saudáveis. O tamanho da amostra calculada foi de 241 indivíduos. Após analisados os critérios de inclusão e exclusão, as amostras foram aleatoriamente selecionadas.

Dos 2.232 indivíduos recrutados para o estudo “Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil” no município de São Paulo, foram empregados os critérios de inclusão e exclusão do presente estudo e depois foram selecionados de modo aleatório 241 indivíduos saudáveis (sem infecção pelo HCV ou HBV) para avaliação da presença dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP*.

3.1.3 Fluxograma de seleção dos indivíduos

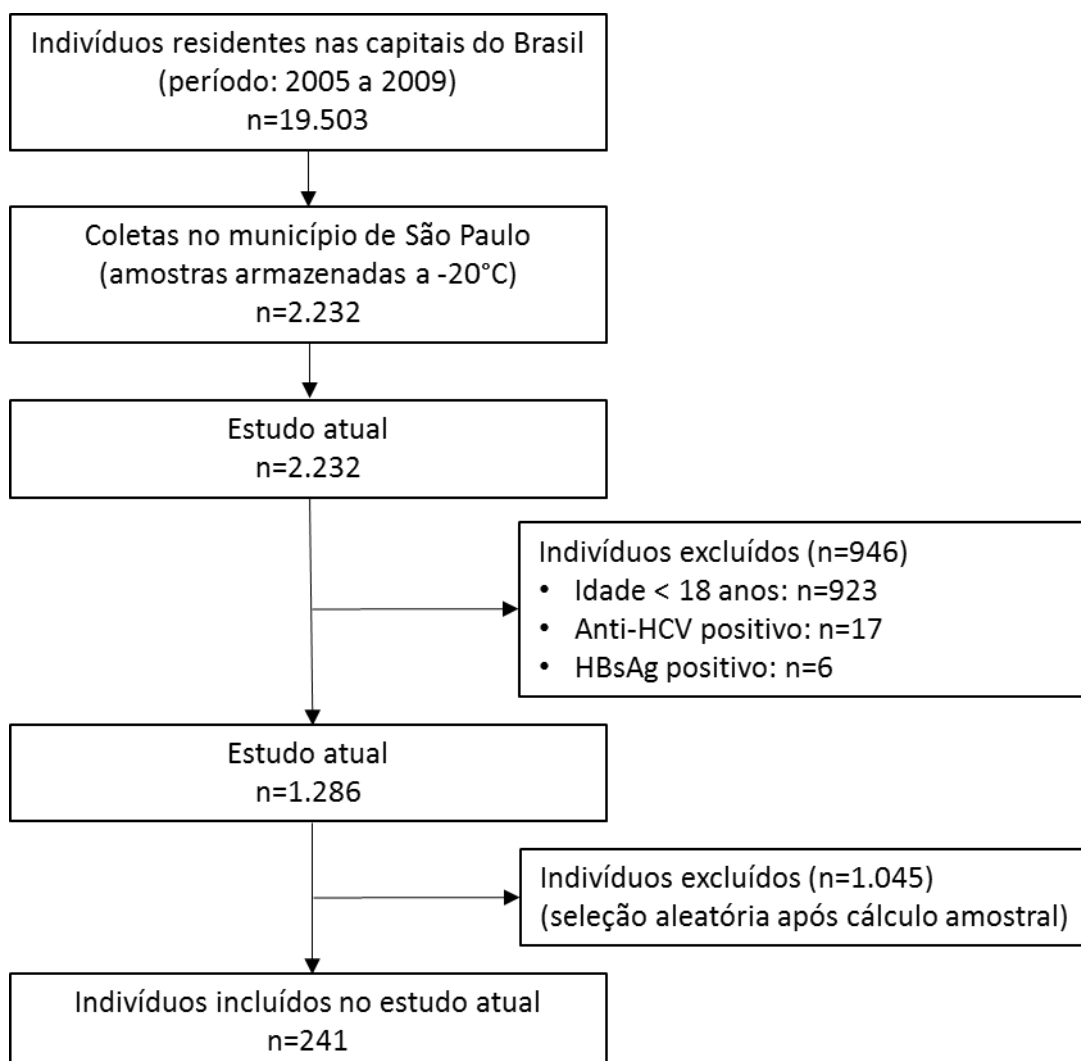
O fluxograma final da seleção do Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV está apresentado na **Figura 4** e o do Grupo 2 - Indivíduos saudáveis está apresentado na **Figura 5**.

Figura 4 - Fluxograma de seleção do Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa PowerPoint 2019.

Figura 5 - Fluxograma de seleção do Grupo 2 - Indivíduos saudáveis



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa PowerPoint 2019.

3.2 Coleta de dados

As informações do Grupo 1 - portadores crônicos do HCV e do Grupo 2 - indivíduos saudáveis foram obtidas dos bancos de dados dos estudos fontes, e para os portadores crônicos do HCV também foi realizada revisão dos prontuários dos pacientes selecionados.

3.2.1 Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV: Avaliação clínica, laboratorial e histológica

Foi realizada a revisão dos dados de interesse e a revisão dos prontuários dos pacientes selecionados para o presente estudo, na qual obtivemos dados do estudo anatomopatológico do fragmento hepático realizado anteriormente ao recebimento de qualquer terapia específica para hepatite C (IFN/Peg-IFN α associado ou não à ribavirina) e dados dos exames laboratoriais. A coleta de sangue para a realização dos exames laboratoriais foi feita no mesmo dia que o paciente aceitou participar do estudo “Manifestações extra-hepáticas”. Foram utilizadas as informações contidas no estudo anatomopatológico do fragmento hepático mais próximo da data da coleta do sangue.

Os exames laboratoriais avaliados foram: alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), insulina, glicose, ferro, ferritina, triglicerídeos, colesterol total e frações (LDL, HDL, VLDL). A determinação da carga viral (níveis séricos de RNA-HCV) foi realizada usando o teste *Amplicor HCV Monitor™ 2.0* (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, Indiana, EUA), e a genotipagem do HCV foi realizada usando o teste *Versant® HCV Genotype 2.0 Line Probe Assay* (LiPA) (Innogenetics, Ghent, Bélgica). O IMC foi calculado com base no peso dividido pela altura ao quadrado (kg/m^2).

Para a avaliação da presença de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV foi realizado o cálculo do índice HOMA-IR, que utiliza os dados de insulina e glicemia em jejum. Os portadores crônicos do HCV que apresentaram HOMA-IR ≥ 3 foram considerados como resistentes à insulina (Moucari et al., 2008; Oliveira et al., 2012). Para o cálculo do índice a fórmula utilizada foi a seguinte (Diniz et al., 2020):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina de jejum } (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{glicemia de jejum } (\text{mg}/\text{dL}) \times 0,0555}{22,5}$$

A biópsia hepática é considerada o método mais preciso e, por muitos, o padrão-ouro para a classificação da fibrose hepática. Esse procedimento foi realizado em todos os portadores crônicos do HCV incluídos no estudo. O grau de fibrose e o grau de atividade inflamatória do fígado foram determinados segundo descrito no sistema METAVIR. Os graus para fibrose hepática variam de F0

(ausência de fibrose) até F4 (cirrose). O grau F1 é caracterizado por fibrose portal sem septos, F2 é caracterizado por fibrose portal com raros septos e F3 é caracterizado por fibrose com numerosos septos, mas sem a presença de cirrose. Os graus de atividade inflamatória variam de A0 (inexistência de atividade inflamatória) até A3 (atividade inflamatória intensa), sendo A1 atividade inflamatória leve e A2 atividade inflamatória moderada (The French METAVIR Cooperative Study Group, 1994). O grau de esteatose hepática foi classificado segundo Kleiner et al. (2005). Os graus para esteatose hepática variam de grau 0: ausência de esteatose (acometendo <5% dos hepatócitos) a grau 3: esteatose acentuada (acometendo >66% dos hepatócitos), sendo que grau 1 indica esteatose discreta (acometendo de 5-33% dos hepatócitos) e grau 2 esteatose moderada (acometendo de 34-66% dos hepatócitos) (Kleiner et al., 2005). A avaliação da siderose hepática foi realizada de acordo com coloração de Perls, variando de 0 a 3.

3.2.2 Grupo 2 - Indivíduos saudáveis: Dados demográficos

Para o Grupo 2 composto por indivíduos saudáveis foi realizada a revisão dos dados de interesse e coletados alguns dados como idade e sexo.

3.3 Detecção dos SNPs no gene *MTTP* para o Grupo 1 (portadores crônicos do HCV) e para o Grupo 2 (indivíduos saudáveis)

A detecção dos SNPs foi realizada no LIM-47, onde normas de qualidade em técnicas de biologia molecular e de biossegurança foram obedecidas. Para garantir a qualidade do teste e assegurar os resultados encontrados, algumas amostras tiveram todas as etapas de genotipagem de SNPs repetidas.

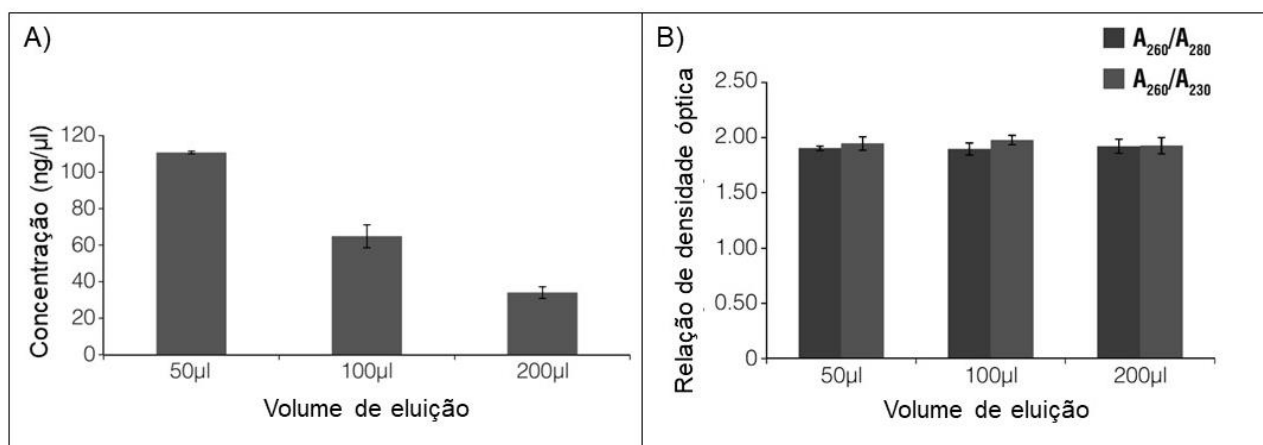
3.3.1 Extração do DNA

O procedimento de extração do DNA dos participantes que compõem o Grupo 1 e Grupo 2 foi realizado a partir de 200 µL soro utilizando o kit *ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Esse kit se baseia na purificação do DNA através de membranas de sílica. A escolha desse kit foi

realizada após obtenção de resultados superiores quando comparados ao kit de extração de DNA do fabricante Kasvi (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, BR). A quantificação média do DNA foi 58% maior usando o kit *ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System*.

A extração do DNA foi padronizada da seguinte maneira: em um tubo previamente identificado com 200 μL do soro do paciente foram adicionados 20 μL de proteinase K e 200 μL do tampão de lise. As amostras foram incubadas em bloco de aquecimento a 56°C. Após 10 minutos (min) de incubação, foram adicionados 250 μL do tampão de lise. Após 10 segundos (seg) de agitação no vórtex, foi realizada a transferência do conteúdo para uma coluna com membrana de sílica (filtro), centrifugado por 1 min a 13.000 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação, foi descartado o tubo coletor com seu conteúdo e colocado um novo tubo coletor de 2 mL. O processo de lavagem foi realizado três vezes e em cada etapa de lavagem foram adicionados 500 μL do tampão de lavagem. Foi realizada centrifugação por 3 min a 13.000 rpm e a coluna colocada em um novo tubo coletor. Ao final das lavagens, a coluna foi colocada em um novo tubo previamente identificado (tubo final de 1,5 mL), no qual foram acrescentados 60 μL água livre de nucleases. Após a centrifugação por 1 min a 14.000 rpm, foram obtidos 60 μL de DNA extraído. O produto final foi armazenado a -80°C até o momento do uso. O DNA foi eluído em 60 μL com o objetivo de ficar mais concentrado para a realização da genotipagem dos SNPs, seguindo descrição do fabricante do kit (**Figura 6**). Segundo o fabricante, a concentração aumenta com a diminuição do volume de eluição, e a pureza medida por espectroscopia de absorvância permanece constante.

Figura 6 - Comparação do volume de eluição com a concentração (A) e pureza (B) usando o kit *ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System*



Fonte: adaptado de Technical Manual *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System* instructions for use of products a5080, a5081 and a5082.

3.3.2 Genotipagem dos SNPs no gene *MTTP*

Os SNPs analisados no presente estudo estão todos localizados no gene *MTTP* (4q23). Após extração do DNA, foi empregado o método de reação em cadeia da polimerase seguida de análise de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), para a detecção de cada SNP no gene *MTTP*. Essa técnica é caracterizada por uma amplificação de um fragmento específico do DNA seguida de uma digestão na qual as enzimas de restrição atuam clivando o fragmento amplificado em sítios específicos. Esses fragmentos são posteriormente visualizados no formato de bandas em gel de agarose.

3.3.2.1 Padronização da PCR

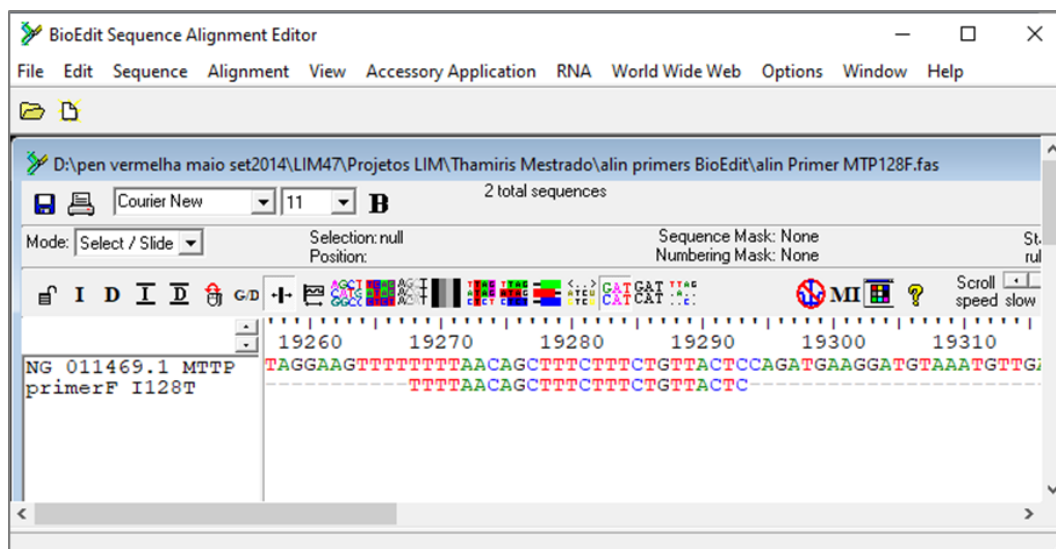
Com o objetivo de realizar a genotipagem dos SNPs no gene *MTTP*, foi empregado primeiramente o método de PCR *in house*. Essa técnica foi desenvolvida por Kary Mullis e consiste na amplificação de DNA de forma exponencial (Mullis, 1986).

3.3.2.1.1 Primers

Para realizar a detecção dos SNPs no gene *MTTP*, foram selecionados *primers* a partir de descrições da literatura (Karpe et al., 1998; Ledmyr et al., 2002). A escolha de *primers* específicos para a região de interesse é uma etapa crucial para uma reação de PCR ser bem-sucedida. Após a escolha dos *primers*, eles foram transformados em formato *fasta* para assim realizar a verificação desses *primers* utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no website do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A ferramenta BLAST busca por regiões de similaridade entre inúmeras sequências. Isso significa que a ferramenta realiza comparações entre sequências de nucleotídeos, como *primers*, em bancos de dados de sequências, em seguida, calcula a significância estatística das correspondências, sendo capaz de confirmar a especificidade dos *primers* selecionados.

Posteriormente, os *primers* em arquivos formato *fasta* foram alinhados com sequência de referência do gene *MTTP* (GenBank-NCBI: NG_011469.1) usando uma outra ferramenta de bioinformática, o *ClustalW Multiple-Sequence Alignment* do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.3. Esse alinhamento se faz necessário para avaliar a similaridade entre o par de *primers* e a região no gene *MTTP* que será amplificada para cada SNP. Um exemplo disso pode ser observado na **Figura 7**, onde o *primer forward* utilizado na detecção do SNP I128T foi alinhado com a sequência de referência do gene *MTTP*. Além disso, após determinar as extremidades flanqueadas pelos *primers forward* e *reverse*, foi possível verificar o tamanho exato do fragmento a ser amplificado pela PCR.

Figura 7 - Alinhamento do *primer forward* utilizado na detecção do polimorfismo I128T com a sequência de referência do gene *MTTP* usando a ferramenta *ClustalW* do programa *BioEdit* entre a posição 19268 e 19293



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa *BioEdit* v.7.0.5.3.

Foram calculadas as temperaturas de hibridização (pareamento) ótimas dos *primers* utilizando a ferramenta *Oligo Calculator - University of Pittsburgh School of Medicine* (<http://www.bioinformatics.org/jambw/3/1/9/index.html>). A temperatura final escolhida para cada par de *primers* foi a que apresentou melhor nitidez de bandas no gel de agarose.

Os *primers* foram sintetizados a uma concentração de 25 nmol (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), em seguida foram ressuspensos a uma concentração de 100 pmol/ μ L (solução estoque) e utilizados na PCR a uma concentração de 10 pmol/ μ L.

3.3.2.1.2 Amplificação dos fragmentos do gene *MTTP*

A etapa seguinte foi padronizar os protocolos das reações de PCR usando o DNA já extraído, baseado nas descrições de Karpe et al. (1998) e Ledmyr et al. (2002). Em relação ao volume de reagentes, inicialmente as reações de amplificação foram padronizadas para um volume final de 50 μ L: 25 μ L de *GoTaq Green Master Mix 2X* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 16 μ L de água ultrapura (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2 μ L de cada *primer* (Invitrogen - Life Technologies,

Carlsbad, Califórnia, EUA) e 5 μL de DNA extraído. Porém, foi realizada uma otimização desse protocolo a fim de diminuir o volume dos reagentes, para assim diminuir os custos por reação e as amostras já ficarem na quantidade necessária para a realização da RFLP. O método de PCR teve o seu protocolo padronizado para um volume final de 16,7 μL (**Tabela 4**). Nessa melhoria foi possível obter uma qualidade de resultados igual a da primeira padronização.

Tabela 4 - Descrição dos reagentes incluídos no protocolo da PCR com volume final de 16,7 μL para detecção dos polimorfismos no gene *MTTP*

Reagentes da PCR	Volume
<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 ultrapura	5,3 μL
DNA extraído	1,7 μL
Volume final	16,7 μL

A amplificação ocorreu no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) ou no *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). As etapas de ciclagem da PCR ocorreram nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 3-5 min, 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 52-60°C por 30 seg e 72°C por 1-2 min, seguida da extensão final a 72°C por 5 min em todas as reações. A temperatura de pareamento dos *primers* divergiu conforme sua composição e tamanho, e foi determinada após o cálculo utilizando a ferramenta *Oligo Calculator* e testes em gel de agarose (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Primers utilizados nas reações de amplificação do gene *MTTP*, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de pareamento dos primers

SNP <i>MTTP</i>	Primers - Sequência 5'- 3'	Fragmento	Temperatura de pareamento
-164T/C rs1800804	F: GGTTTGGTTTAGCTCTCAAAGTG R: AGTGAGGGAGTGACCCTCTTC	220 pb	56°C
-400A/T rs1800803	F: CCCTCTTAATCTCTTTCCTAGAA R: AAGAATCATATTGACCAGCAATC	838 pb	55°C
H297Q rs2306985	F: GAATGATTATAATATAGCATTTC R: GTCTGATGTCATGATTATTCC	231 pb	52°C
-493G/T rs1800591	F: AGTTTCACACATAAGGACAATCATCTA R: GGATTTAAATTTAAACTGTTAATTCATATCAC	109 pb	55°C
I128T rs3816873	F: TTTTAACAGCTTTCTTTCTGTTACTC R: GTTGTGGAATCTAAACGCCCTTTATCCTTCCATGG	199 pb	60°C
Q95H rs61733139	F: ATGAAGGATGTAAATGTTGAAAATGTGAATCTGCA R: AGTTGGAGAAAAAGTTGTGGAATC	183 pb	56°C
Q244E rs17599091	F: GATGATTACTTGTATAAAGATGG R: AAAATTTTAGCATTATCTTACTTCG	201 pb	53°C

pb: Pares de base; F: *Forward*; R: *Reverse*

3.3.2.1.3 Identificação do produto amplificado

Posteriormente à amplificação pela PCR, a visualização do produto foi feita por eletroforese em gel de agarose na concentração de 3%. Para essa concentração foram empregados 100 mL de tampão TBE na concentração de 1% (Tris-Borato EDTA - Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 3 gramas de agarose (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e 6 µL de corante fluorescente *UniSafe Dye* (20.000x - Uniscience, Miami, Flórida, EUA) que se intercala entre as bases do DNA.

No gel foram aplicados 4 µL do padrão de peso molecular de DNA (50 pb ou 100 pb) (*DNA Ladder* - Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 5 µL do produto amplificado pela PCR. Antes do seu uso inicial, o padrão de tamanho molecular foi diluído: 5 µL do padrão, 90 µL de água ultrapura e 20 µL do *BlueJuice Gel Loading Buffer* (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA).

A corrida foi realizada em uma cuba de eletroforese, *Horizon 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), que

continha tampão TBE na concentração de 0,5%. A separação das bandas ocorreu em uma corrente constante de 100V e 400 amperes durante 50 min. Imediatamente depois da eletroforese, as bandas foram visualizadas e fotografadas com o uso de transiluminador de luz ultravioleta, Fotodocumentador UVIdoc HD2 (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido). Em cada corrida no gel de agarose foi incluída um controle negativo da reação, para esse controle foi utilizado água ultrapura, ao invés do DNA extraído.

3.3.2.2 Padronização da RFLP

A técnica de RFLP foi desenvolvida para auxiliar na genotipagem de SNPs em regiões específicas do genoma (Maeda et al., 1989). Após a amplificação do fragmento contendo o SNP de interesse pela PCR, foi realizada uma digestão utilizando uma enzima de restrição de endonuclease específica que reconhece um dos alelos do SNP, a fim de clivar o fragmento amplificado em sítios específicos para subsequente diferenciação dos alelos por tamanho.

3.3.2.2.1 Mapa de predição de endonuclease

Para realizar a padronização da reação RFLP, foram construídos mapas de predição de endonucleases (**Figuras 8-14**) usando a ferramenta NEBcutter v.2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Esses mapas foram criados com o objetivo de identificar o local exato do corte de cada uma das enzimas de restrições utilizadas para detectar os SNPs no gene *MTTP*. Os fragmentos indicados pelos mapas foram comparados com os padrões observados no gel de agarose após a digestão enzimática. As enzimas de restrição escolhidas foram descritas por Karpe et al. (1998) e Ledmyr et al. (2002).

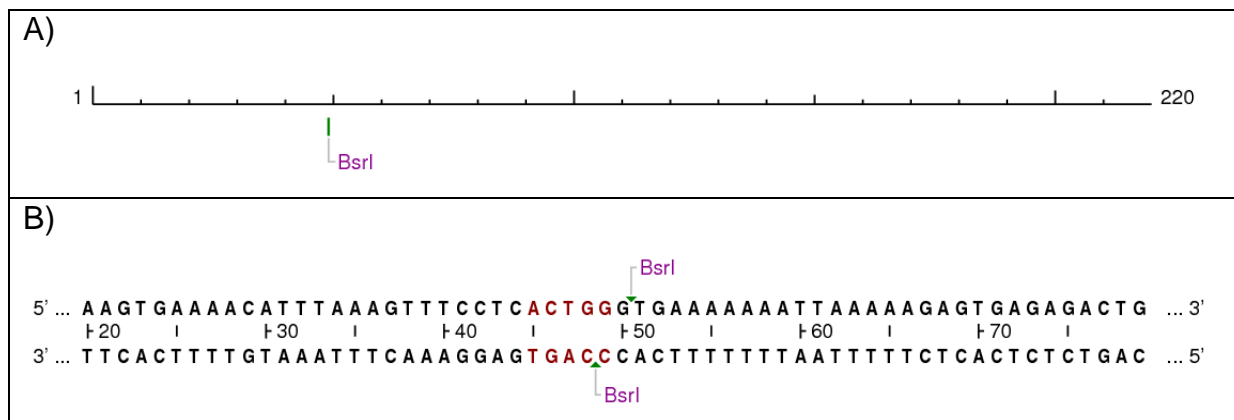
Para a construção dos mapas, foi usada uma sequência de nucleotídeos do gene *MTTP* com 66915 pb que está a disposição no GenBank-NCBI (GenBank: NG_011469). Essa sequência do gene *MTTP* foi alinhada com os *primers forward* e *reverse* usados na PCR com o auxílio da ferramenta *BioEdit Sequence Alignment Editor*, determinando o tamanho exato dos fragmentos amplificados para a pesquisa

de cada SNP. Essas sequências foram utilizadas na ferramenta NEBcutter, e desse modo, observaram-se os tamanhos dos fragmentos que seriam gerados na RFLP.

Em relação à genotipagem do SNP -164T/C, na **Figura 8** pode ser observado o ponto no qual a enzima *BsrI* realiza o corte no fragmento amplificado pela PCR. Com base na sequência amplificada, verifica-se que, quando há a substituição do nucleotídeo T por C na posição 46, a enzima de restrição corta na posição 50 do fragmento amplificado. Desse modo, quando a sequência apresenta o alelo C (mutado) a enzima cliva o fragmento inicial, que apresentava 220 pb, em outros dois de tamanhos distintos, sendo um contendo 170 pb e o outro contendo 50 pb. Já na presença do alelo T (selvagem), o local no qual enzima realiza o corte não existe e, portanto, o fragmento continua com o tamanho inicial de 220 pb.

Figura 8 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene *MTTP* incluindo o polimorfismo -164T/C

A) Mapa da sequência completa de 220 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 20 ao 79, destacando a posição de corte (nucleotídeo 50) da enzima de restrição *BsrI*



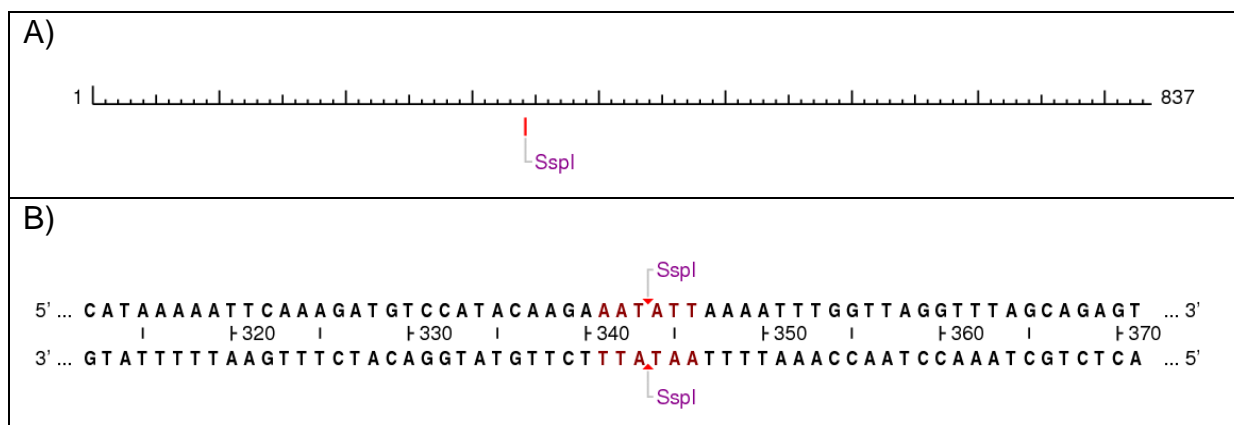
Fonte: elaborado pelo autor usando a ferramenta NEBcutter v.2.0.

Em relação à genotipagem do SNP -400A/T, na **Figura 9** pode ser observado o ponto no qual a enzima *SspI* realiza o corte no fragmento amplificado pela PCR. Durante o alinhamento da sequência do gene *MTTP* com os *primers forward* e *reverse* descritos por Karpe et al. (1998) para avaliar a similaridade entre o par de *primers* e a região no gene *MTTP*, foi encontrado um nucleotídeo a mais no *primer forward*, então, o fragmento amplificado que seria constituído por 837 pb passou a ser constituído por 838 pb. Com base na sequência amplificada, verifica-se que,

quando há a substituição do nucleotídeo A por T na posição 343, a enzima de restrição realiza um corte no fragmento amplificado. Desse modo, quando a sequência apresenta o alelo T (mutado) a enzima cliva o fragmento inicial, que apresentava 838 pb, em outros dois de tamanhos distintos, sendo um contendo 494 pb e o outro contendo 344 pb. Já na presença do alelo A (selvagem), o local no qual a enzima realiza o corte não existe e, portanto, o fragmento continua com o tamanho inicial de 838 pb.

Figura 9 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene *MTTP* incluindo o polimorfismo -400A/T

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*



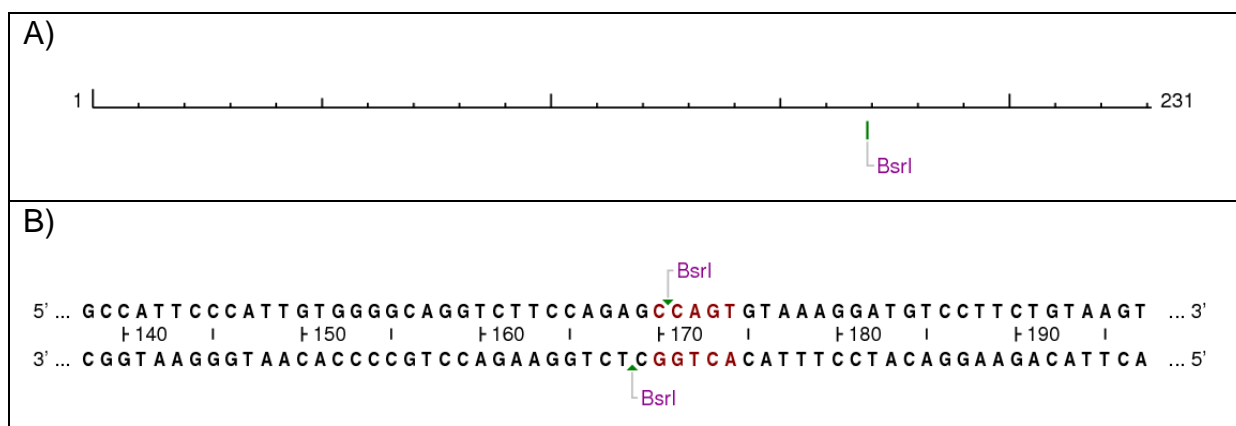
Fonte: elaborado pelo autor usando a ferramenta NEBcutter v.2.0.

Em relação à genotipagem do SNP H297Q, na **Figura 10** pode ser observado o ponto no qual a enzima *BsrI* realiza o corte no fragmento amplificado pela PCR. Para esse polimorfismo a troca do nucleotídeo citosina (C) por guanina (G) na posição 173 ocasiona uma troca do aminoácido que será produzido, de histidina (H) para glutamina (Q). Com base na sequência amplificada, verifica-se que, quando há a substituição do nucleotídeo C por G na posição 173, a enzima de restrição corta na posição 170 do fragmento amplificado. Desse modo, quando a sequência apresenta o alelo G (mutado) a enzima cliva o fragmento inicial, que apresentava 231 pb, em outros dois de tamanhos distintos, sendo um contendo 170 pb e o outro contendo 61 pb. Já na presença do alelo C (selvagem), o local no qual a enzima

realiza o corte não existe e, portanto, o fragmento continua com o tamanho inicial de 231 pb.

Figura 10 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene *MTTP* incluindo o polimorfismo H297Q

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*

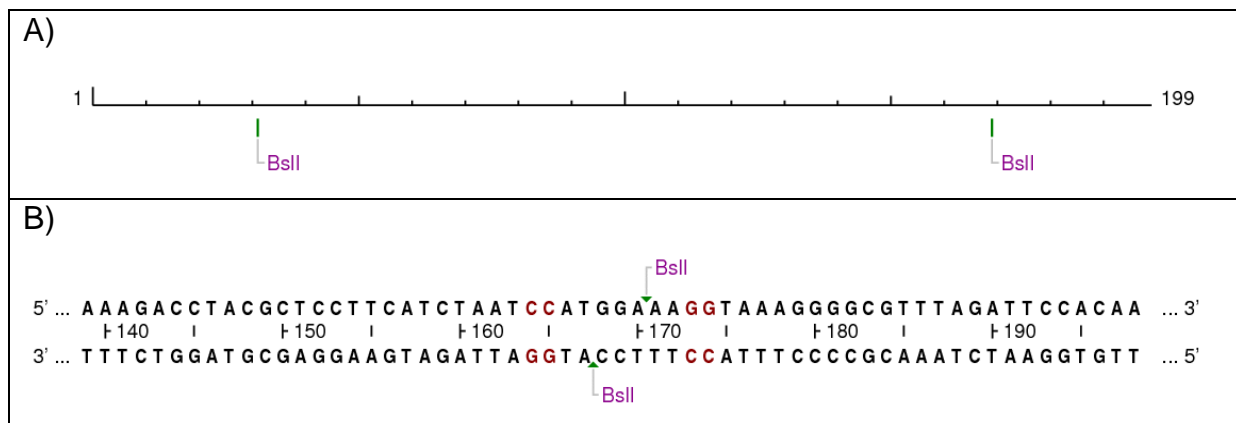


Fonte: elaborado pelo autor usando a ferramenta NEBcutter v.2.0.

Em relação à genotipagem do SNP -493G/T, na **Figura 11** pode ser observado o ponto no qual a enzima *HphI* realiza o corte no fragmento amplificado pela PCR. Com base na sequência amplificada, verifica-se que, na presença do alelo G (selvagem) a enzima de restrição realiza o corte na posição 89 do fragmento amplificado. Desse modo, quando a sequência apresenta o alelo G (selvagem) a enzima cliva o fragmento inicial, que apresentava 109 pb, em outros dois de tamanhos distintos, sendo um contendo 89 pb e o outro contendo 20 pb. Já na presença do alelo T (mutado), o local no qual enzima realiza o corte não existe e, portanto, o fragmento continua com o tamanho inicial de 109 pb.

Figura 12 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene *MTTP* incluindo o polimorfismo I128T

A) Mapa da sequência amplificada de 199 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 139 ao 198, destacando a posição de corte (nucleotídeo 167) da enzima de restrição *BslI*

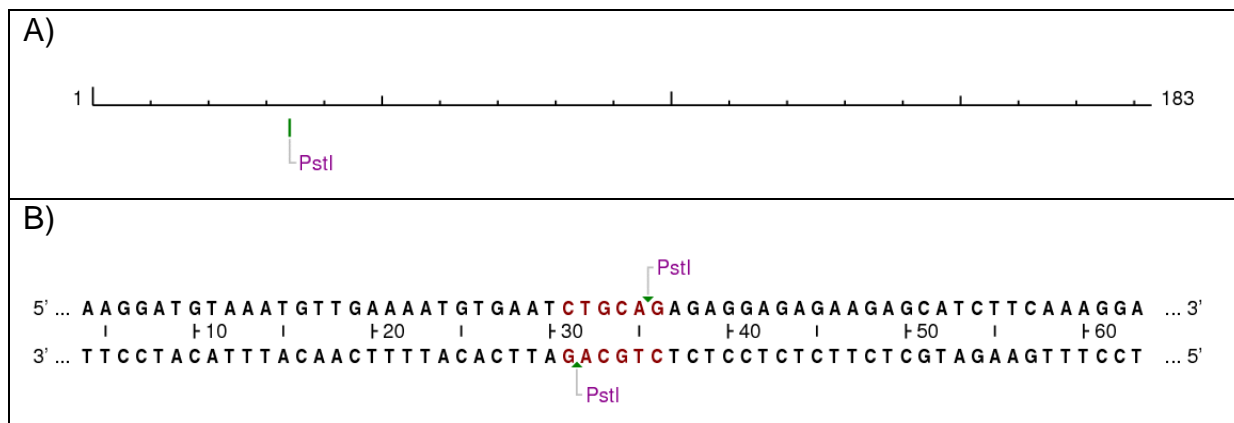


Fonte: elaborado pelo autor usando a ferramenta NEBcutter v.2.0.

Em relação à genotipagem do SNP Q95H, na **Figura 13** pode ser observado o ponto no qual a enzima *PstI* realiza o corte no fragmento amplificado pela PCR. Para esse polimorfismo a troca do nucleotídeo guanina (G) por citosina (C) na posição 35 ocasiona uma troca do aminoácido que será produzido, de glutamina (Q) para histidina (H). Com base na sequência amplificada, verifica-se que, na presença do alelo G (selvagem) a enzima de restrição realiza o corte na posição 35 do fragmento amplificado. Desse modo, quando a sequência apresenta o alelo G (selvagem) a enzima cliva o fragmento inicial, que apresentava 183 pb, em outros dois de tamanhos distintos, sendo um contendo 148 pb e o outro contendo 35 pb. Já na presença do alelo C (mutado), o local no qual enzima realiza o corte não existe e, portanto, o fragmento continua com o tamanho inicial de 183 pb.

Figura 13 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene *MTTP* incluindo o polimorfismo Q95H

A) Mapa da sequência amplificada de 183 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 4 ao 63, destacando a posição de corte (nucleotídeo 35) da enzima de restrição *Pst*I

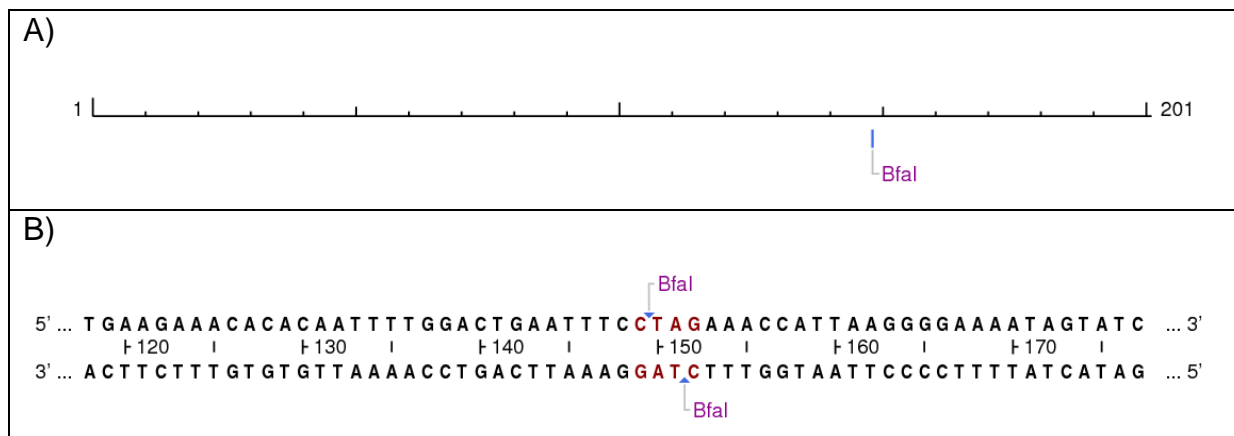


Fonte: elaborado pelo autor usando a ferramenta NEBcutter v.2.0.

Em relação à genotipagem do SNP Q244E, na **Figura 14** pode ser observado o ponto no qual a enzima *Bfal* realiza o corte no fragmento amplificado pela PCR. Para esse polimorfismo a troca do nucleotídeo citosina (C) por guanina (G) na posição 152 ocasiona uma troca do aminoácido que será produzido, de glutamina (Q) para ácido glutâmico (E). Com base na sequência amplificada, verifica-se que, quando há a substituição do nucleotídeo C por G na posição 152, a enzima de restrição corta na posição 149 do fragmento amplificado. Desse modo, quando a sequência apresenta o alelo G (mutado) a enzima cliva o fragmento inicial, que apresentava 201 pb, em outros dois de tamanhos distintos, sendo um contendo 149 pb e o outro contendo 52 pb. Já na presença do alelo C (selvagem), o local no qual a enzima realiza o corte não existe e, portanto, o fragmento continua com o tamanho inicial de 201 pb.

Figura 14 - Mapa de restrição enzimática de fragmento da sequência do gene *MTTP* incluindo o polimorfismo Q244E

A) Mapa da sequência completa de 201 pb. B) Mapa ampliado mostrando do nucleotídeo 118 ao 177, destacando a posição de corte (nucleotídeo 149) da enzima de restrição *Bfal*



Fonte: elaborado pelo autor usando a ferramenta NEBcutter v.2.0.

3.3.2.2 Digestão enzimática

Após a confirmação do local de atuação de cada enzima de restrição, foi padronizada a quantidade de cada reagente utilizado na reação para a digestão enzimática e o equipamento utilizado para a incubação da enzima. Geralmente, para o ensaio da RFLP, os protocolos descrevem que a etapa de incubação da enzima acontece em banho-maria. Porém, quando foi realizado esse teste com as enzimas utilizadas, não foi observada a clivagem do fragmento. A partir disso foi realizada a incubação das enzimas nos termocicladores *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) ou no *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) esses equipamentos foram utilizados por manterem a temperatura mais estável e assim foi observado o local exato de clivagem das enzimas de restrição.

As reações de RFLP foram padronizadas para um volume final de 20 µl: 15 µl do produto da PCR, 2 µl de água ultrapura, 2 µl do tampão correspondente de cada enzima e 0,5-1 µl da enzima de restrição de endonuclease (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA), variando conforme a concentração utilizada. A temperatura e tempo de incubação variaram de acordo com cada enzima seguindo a determinação do fabricante.

3.3.2.2.3 Identificação do produto digerido

Após as digestões com as enzimas de restrição foi possível identificar os genótipos de cada SNP como bandas no gel de agarose (*Agarose, LE, Analytical Grade* - Promega, Madison, Wisconsin, EUA) concentrado a 3% após eletroforese. Os padrões de peso molecular (50 pb ou 100 pb) foram utilizados como referência. Essas bandas em gel de agarose foram necessárias para determinar os genótipos de cada SNPs analisado no gene *MTTP* (Tabela 6).

Tabela 6 - Enzimas de restrição de endonuclease, concentração das enzimas, temperatura de digestão e perfis genotípicos observados no gel de agarose após reação de RFLP para os polimorfismos no gene *MTTP*

Polimorfismo <i>MTTP</i>	Enzima de restrição	Concentração da enzima	Temperatura de digestão da enzima	Tempo de incubação da enzima	Genótipos
-164T/C rs1800804	<i>BsrI</i>	5 U/μL	65°C	30 min	TT: 220 pb TC: 220, 170 e 50 pb CC: 170 e 50 pb
-400A/T rs1800803	<i>SspI</i>	5 U/μL	37°C	15 min	AA: 838 pb AT: 838, 494 e 344 pb TT: 494 e 344 pb
H297Q rs2306985	<i>BsrI</i>	5 U/μL	65°C	15 min	HH: 231 pb HQ: 231, 170 e 61 pb QQ: 170 e 61 pb
-493G/T rs1800591	<i>HphI</i>	5 U/μL	37°C	180 min	GG: 89 e 20 pb GT: 109, 89 e 20 pb TT: 109 pb
I128T rs3816873	<i>BsrI</i>	5 U/μL	55°C	15 min	II: 167 pb IT: 167, 138 e 29 pb TT: 138 e 29 pb
Q95H rs61733139	<i>PstI</i>	5 U/μL	37°C	15 min	QQ: 148 e 35pb QH: 183, 148 e 35 pb HH: 183 pb
Q244E rs17599091	<i>BfaI</i>	10 U/μL	37°C	60 min	QQ: 201 pb QE: 201, 149 e 52 pb EE: 149 e 52 pb

pb: Pares de base

3.4 Modelos genéticos

Não existem evidências claras do melhor modelo genético de herança em genes em doenças complexas. Desse modo, sugere-se avaliar essas associações em vários modelos genéticos (Thakkinstian et al., 2005). Os modelos genéticos utilizados foram:

- Modelo codominante: é caracterizado por avaliar separadamente cada um dos genótipos. Por exemplo, em um SNP onde os possíveis genótipos são AA, AB e BB: AA *versus* AB *versus* BB
- Modelo dominante: é caracterizado por avaliar o homocigoto selvagem *versus* o heterocigoto mais o homocigoto mutado, pois se deduz que o alelo mutado aumenta o risco. Por exemplo, em um SNP onde os possíveis genótipos são AA, AB e BB: AA *versus* AB+ BB
- Modelo recessivo: é caracterizado por avaliar o homocigoto selvagem mais o heterocigoto *versus* o homocigoto mutado. Por exemplo, em um SNP onde os possíveis genótipos são AA, AB e BB: AA + AB *versus* BB

3.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA) e as análises foram realizadas no IBM-SPSS para *Windows* versão 20.0 (International Business Machines, Nova Iorque, Nova Iorque, EUA).

Nos portadores crônicos do HCV (Grupo 1), foram descritas as características como frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas; e como média e desvio padrão para as variáveis quantitativas (Kirkwood; Sterne, 2006). Todas as características descritas foram avaliadas (incluindo os níveis de lipídeos) segundo o genótipo dos SNPs -493G/T, I128T, Q95H e Q244E com diferentes modelos genéticos (modelo codominante, modelo dominante e modelo recessivo) e verificadas a associação das características dos portadores crônicos do HCV com os modelos genéticos utilizados por meio de testes qui-quadrado, testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhança (Kirkwood; Sterne, 2006).

Os graus de esteatose hepática, também, foram descritos segundo os três modelos genéticos e foi verificada a existência de associação com uso de testes da razão de verossimilhança ou testes qui-quadrado. A frequência de esteatose foi descrita segundo as características, verificada a associação com uso de testes exatos de Fisher ou testes qui-quadrado, 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 -493G/T, I128T, Q95H e Q244E 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 nos portadores crônicos do HCV. Foram incluídas no modelo múltiplo de regressão logística todas as variáveis e as interações que nos testes bivariados apresentaram nível de significância de 0,20 ($p < 0,2$). Todos os SNPs, -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E, também foram analisados dois a dois no modelo múltiplo de regressão logística para avaliar em conjunto quais SNPs influenciam a presença de esteatose nos pacientes com hepatite C crônica. Isto é, para avaliar se o indivíduo com o alelo mutado de determinado polimorfismo mais o alelo mutado de outro polimorfismo, todos no gene *MTTP*, poderia impactar no desenvolvimento da esteatose.

Ainda em relação ao Grupo 1, adicionalmente foram realizadas interações de primeira ordem dos genótipos de todos os SNPs (-164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E) com cada característica e testadas isoladamente para depois serem inseridas no modelo múltiplo de regressão logística com o intuito de avaliar quais características também influenciam a presença de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV.

3.6 Análise genética

3.6.1 Frequência gênica e genotípica

Para caracterização genética dos SNPs nos portadores crônicos do HCV e nos indivíduos saudáveis, foram calculadas as frequências gênicas (ou alélicas) e as

frequências genóticas dos SNPs genotipados no gene *MTTP* usando a ferramenta *SNPStats* do Institut Català d'Oncologia (<https://www.snpstats.net/start.htm>). A frequência gênica é caracterizada pela frequência encontrada para cada um dos alelos, ou seja, é a proporção dos diferentes alelos de um gene na população estudada. A frequência genotípica é caracterizada pela frequência encontrada dos genótipos do gene em determinada população, ou seja, corresponde às proporções dos diferentes genótipos para o gene considerado (Nussbaum; McInnes; Willard, 2002).

3.6.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg baseia-se na comparação das frequências genóticas obtidas com as frequências genóticas esperadas segundo o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, isto é, quando uma população não apresenta alteração na frequência de alelos ao longo das gerações. As frequências dos alelos podem variar com o tempo e o espaço ou podem permanecer estáveis em gerações sucessivas, e se as frequências permanecem estáveis pode ser considerado que naquela população tal gene está em equilíbrio genético (Nussbaum; McInnes; Willard, 2002; Wigginton; Cutler; Abecasis, 2005).

No nível populacional, a hipótese nula para o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg é que não existem diferenças significativas entre os números de indivíduos observados e esperados para cada genótipo. Vários métodos foram propostos para testar essa hipótese, mas os dois métodos principais e mais tradicionalmente usados são o teste qui-quadrado (χ^2) e os testes exatos (Ryckman; Williams, 2008). No presente estudo a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feita pelo teste qui-quadrado utilizando a ferramenta *Michael H. Court's (2005–2008) excel calculator* da Universidade Tufts, considerado em equilíbrio quando $p \geq 0,05$.

3.6.3 Desequilíbrio de Ligação

Para a análise do desequilíbrio de ligação entre os pares de SNPs foi calculado o valor médio de D' e o valor do coeficiente de correlação (r^2) utilizando a

ferramenta Haploview v.4.1 (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, EUA). Essa análise consiste em verificar se existe uma associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci* localizados ou não em um mesmo cromossomo (Barrett et al., 2005).

3.6.4 Teste de haplótipos

A ferramenta SNPStats auxilia na análise de estudos de associação genético-epidemiológica de SNPs. Essa ferramenta está disponível pelo *Institut Català d'Oncologia* (<https://www.snpstats.net/start.htm>) e foi utilizada para realizar testes de associação dos SNPs na forma de haplótipos por meio de uma regressão logística multivariada. Com essa análise é possível avaliar se a combinação de haplótipos influencia ou não o desfecho ou variável. Para essa análise foi utilizada uma frequência mínima do conjunto de haplótipos de 1% (Solé et al., 2006).

3.7 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte do projeto intitulado “Alterações genéticas no gene *MTTP* e sua relação com níveis de lipídeos plasmáticos e esteatose hepática em pacientes com hepatite C”, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), número do parecer 1.645.384/2016 (**Anexo A**).

Conforme mencionado anteriormente, foram coletados soro e dados dos portadores crônicos do HCV incluídos no projeto de pesquisa “Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal” (CAPPesq - nº 0914/09). Esse soro foi armazenado em freezer a -80°C no LIM-47 para posterior análise. Os participantes do estudo foram contatados, para assim fornecer explicação sobre todos os objetivos da atual pesquisa e realizar a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo B**). O paciente também recebeu a informação que era possível participar ou recusar ou até mesmo desistir da sua participação na pesquisa em qualquer momento do estudo, sem qualquer prejuízo. Além disso, os

participantes foram identificados por números a fim de manter sigilo sob cada identidade.

Posteriormente, uma emenda foi aprovada solicitando a inclusão no estudo inicial, de um grupo de 241 indivíduos saudáveis do mesmo município, São Paulo, para realização da genotipagem dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* utilizando a metodologia já descrita no projeto. Esse material foi coletado para a condução de exames laboratoriais para detecção de hepatites virais do projeto “Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil” (CAPPesq - nº 0283/07) e está armazenado no IMT/USP. Para o presente estudo foi autorizada a dispensa do TCLE. Essa Emenda foi aprovada pela CAPPesq, número do parecer 2.779.235/2018 (**Anexo C**).

4. RESULTADOS

Foi realizada a detecção de sete diferentes SNPs (-164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E) no gene *MTTP* em 236 portadores crônicos do HCV (Grupo 1) atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP, e a detecção de sete diferentes SNPs (-164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E) do gene *MTTP* em 241 indivíduos saudáveis (Grupo 2).

4.1 Características gerais

Dados acerca das características gerais dos portadores crônicos do HCV incluídos no estudo foram inicialmente descritos pelo autor em sua dissertação de mestrado (Prata, 2019b). Dos 236 portadores crônicos do HCV incluídos no estudo (Grupo 1), 56,4% eram do sexo feminino e a média de idade foi de 55,5 anos (29-83). Dos 241 indivíduos saudáveis incluídos no estudo (Grupo 2), 65,6% eram do sexo feminino e a média de idade foi de 43,3 anos (18-69). A **Tabela 7** apresenta as principais características demográficas e clínicas. A distribuição dos portadores crônicos do HCV considerando a classificação do IMC foi: 0,8% baixo peso, 38,1% peso normal, 41,6% sobrepeso e 19,5% obeso. Em relação aos grupos raciais, 81,3% dos pacientes se autodeclararam como brancos. Além disso, dentre as comorbidades, a hipertensão arterial apresentou prevalência de 36,4%. Ainda na **Tabela 7**, pode ser observada a distribuição dos pacientes em relação a todos os fatores de risco conhecidos para aquisição do HCV e em relação aos seus hábitos. A principal forma possível de aquisição do vírus foi por transfusão sanguínea relatada em entrevista sobre antecedentes epidemiológicos, correspondendo a 41,5% dos portadores crônicos do HCV.

Tabela 7 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o sexo, faixa etária, IMC, comorbidades, antecedentes epidemiológicos em potencial para aquisição do HCV, etilismo e tabagismo

Características	n (%) / média ± DP
Sexo (Feminino)	133 (56,4)
Idade (anos)	55,5 ± 12
IMC^a	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)
Transusão 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 Informação não disponível para todos

DP: Desvio padrão; IMC: Índice de massa corporal

Na **Tabela 8** estão descritas as médias dos níveis séricos e suas variações nos exames laboratoriais. Médias acima dos valores de referência foram encontradas em relação ao HOMA-IR e as enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT). A distribuição dos genótipos responsáveis pela infecção do HCV nos pacientes está apresentada no **Gráfico 1**, sendo que a maioria das infecções foi pelo genótipo 1 do vírus (77%). Em relação à carga viral, 133 pacientes (58,6%) apresentaram carga viral considerada elevada (≥ 850.000 IU/mL).

Tabela 8 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com os exames laboratoriais

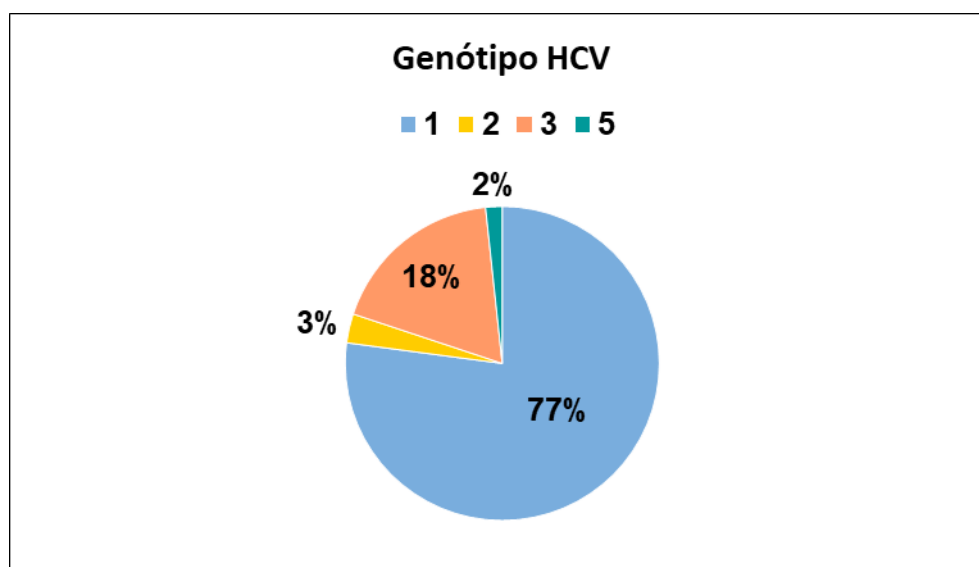
Exames Laboratoriais	Média ± DP	Valor de referência ^b
Glicose	89,7 ± 39,2	>99 mg/dL
Insulina ^a	14,1 ± 11,6	≥25 µU/mL
ALT	60,9 ± 45,2	≥41 U/L
AST	49,5 ± 38,3	≥37 U/L
GGT	87,3 ± 99,9	≥61 U/L
Ferro ^a	125,6 ± 53,1	>158 µg/dL
Ferritina ^a	335,4 ± 384,3	>400 ng/mL
Colesterol Total	172,9 ± 38,9	≥200 mg/dL
HDL	54,6 ± 17	≤60 mg/dL
LDL	96,9 ± 34,6	≥130 mg/dL
VLDL	21,4 ± 11,9	≥40 mg/dL
Triglicerídeos	107 ± 61,4	≥200 mg/dL
HOMA-IR ^a	3,3 ± 3,5	≥3,0

^a Informação não disponível para todos

^b Valor de referência quando considerado alterado

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*

Gráfico 1 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o genótipo do vírus



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Excel 2003.

Em relação à distribuição dos portadores crônicos do HCV, segundo as características do estudo anatomopatológico do fragmento hepático, pode ser observado que a esteatose encontrou-se presente em 53% dos pacientes do estudo (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Distribuição dos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com as características anatomopatológicas encontradas em fragmento hepático

Variável	n (%)
Esteatose	
Ausente	111 (47,0)
Presente	125 (53,0)
Fibrose	
0-2	187 (79,2)
3-4	49 (20,8)
Atividade Inflamatória	
0-1	80 (33,9)
2-3	156 (66,1)
Siderose	
Ausente	221 (93,6)
Presente	15 (6,4)

4.2 Características associadas à esteatose hepática

Análises bivariada (**Tabelas 10 e 11**) e multivariada foram realizadas para avaliar quais fatores estavam associados com a esteatose hepática (desfecho) em portadores crônicos do HCV. As variáveis que apresentaram o $p < 0,20$ na análise bivariada foram incluídas na análise multivariada (**Tabela 12**). Na análise multivariada, 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 ($p < 0,001$) foram associados com a presença de esteatose.

Tabela 10 - Fatores associados à presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236)

Variável	Total n=236 n (%)	Esteatose		OR	IC 95%	p
		Ausente n (%)	Presente n (%)			
Idade (anos)						0,021
<50	68 (28,8)	40 (58,8)	28 (41,2)	1,00		
≥50	168 (71,2)	71 (42,3)	97 (57,7)	1,95	1,10-3,46	
Sexo						0,047
Masculino	103(43,6)	56 (54,4)	47 (45,6)	1,00		
Feminino	133 (56,4)	55 (41,4)	78 (58,6)	1,69	1,01-2,84	
Genótipo 3 HCV						0,005
Não	193 (81,8)	99 (51,3)	94 (48,7)	1,00		
Sim	43 (18,2)	12 (27,9)	31 (72,1)	2,72	1,32-5,61	
Fibrose						0,004
0-2	187 (79,2)	97 (51,9)	90 (48,1)	1,00		
3-4	49 (20,8)	14 (28,6)	35 (71,4)	2,69	1,36-5,33	
Atividade Inflamatória						<0,001
0-1	80 (33,9)	57 (71,3)	23 (28,8)	1,00		
2-3	156 (66,1)	54 (34,6)	102 (65,4)	4,68	2,61-8,41	
Siderose						0,272
Ausente	221 (93,6)	106 (48,0)	115 (52,0)	1,00		
Presente	15 (6,4)	5 (33,3)	10 (66,7)	1,84	0,61-5,57	
Hipertensão Arterial						0,140
Não	150 (63,5)	76 (50,7)	74 (49,3)	1,00		
Sim	86 (36,5)	35 (40,7)	51 (59,3)	1,50	0,88-2,56	
Diabetes Mellitus						0,735
Não	200 (84,8)	95 (47,5)	105 (52,5)	1,00		
Sim	36 (15,2)	16 (44,4)	20 (55,6)	1,13	0,55-2,31	
IMC^a						0,669
<25	92 (39,8)	45 (48,9)	47 (51,1)	1,00		
≥25	139 (60,2)	64 (46,0)	75 (54,0)	1,12	0,66-1,90	

^a Informação não disponível para todos

Teste qui-quadrado; Análise bivariada

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; HCV: Vírus da hepatite C; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 11 - Exames laboratoriais associados à presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236)

Variável	Total n=236 n (%)	Esteatose		OR	IC 95%	p
		Ausente n (%)	Presente n (%)			
ALT (U/L)						0,066
<41	100 (42,4)	54 (54,0)	46 (46,0)	1,00		
≥41	136 (57,6)	57 (41,9)	79 (58,1)	1,63	0,97-2,74	
AST (U/L)						0,001
<37	115 (48,7)	67 (58,3)	48 (41,7)	1,00		
≥37	121 (51,3)	44 (36,4)	77 (63,6)	2,44	1,45-4,13	
GGT (U/L)						0,038
8-61	132 (56,0)	70 (53,0)	62 (47,0)	1,00		
>61	104 (44,0)	41 (39,4)	63 (60,6)	1,74	1,03-2,92	
Colesterol Total (mg/dL)						0,839
<200	180 (76,3)	84 (46,7)	96 (53,3)	1,00		
≥200	56 (23,7)	27 (48,2)	29 (51,8)	0,94	0,52-1,71	
HDL (mg/dL)						0,524
>60	75 (31,7)	33 (44,0)	42 (56,0)	1,00		
≤60	161 (68,3)	78 (48,4)	83 (51,6)	0,84	0,48-1,45	
LDL (mg/dL)						0,450
<130	198 (83,9)	91 (46,0)	107 (54,0)	1,00		
≥130	38 (16,1)	20 (52,6)	18 (47,4)	0,77	0,38-1,53	
VLDL (mg/dL)						0,785
<40	220 (93,2)	104 (47,3)	116 (52,7)	1,00		
≥40	16 (6,8)	7 (43,8)	9 (56,3)	1,15	0,42-3,21	
Triglicerídeos (mg/dL)						0,977
<200	221 (93,6)	104 (47,1)	117 (52,9)	1,00		
≥200	15 (6,4)	7 (46,7)	8 (53,3)	1,02	0,36-2,90	
HOMA-IR^a						0,028
<3	152 (65,5)	80 (52,6)	72 (47,4)	1,00		
≥3	80 (34,5)	30 (37,5)	50 (62,5)	1,85	1,07-3,22	

^a Informação não disponível para todos

Teste qui-quadrado; Análise bivariada

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; 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 12 - Análise multivariada dos fatores associados à presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236)

Variável	OR	IC 95%	p
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: <0,05

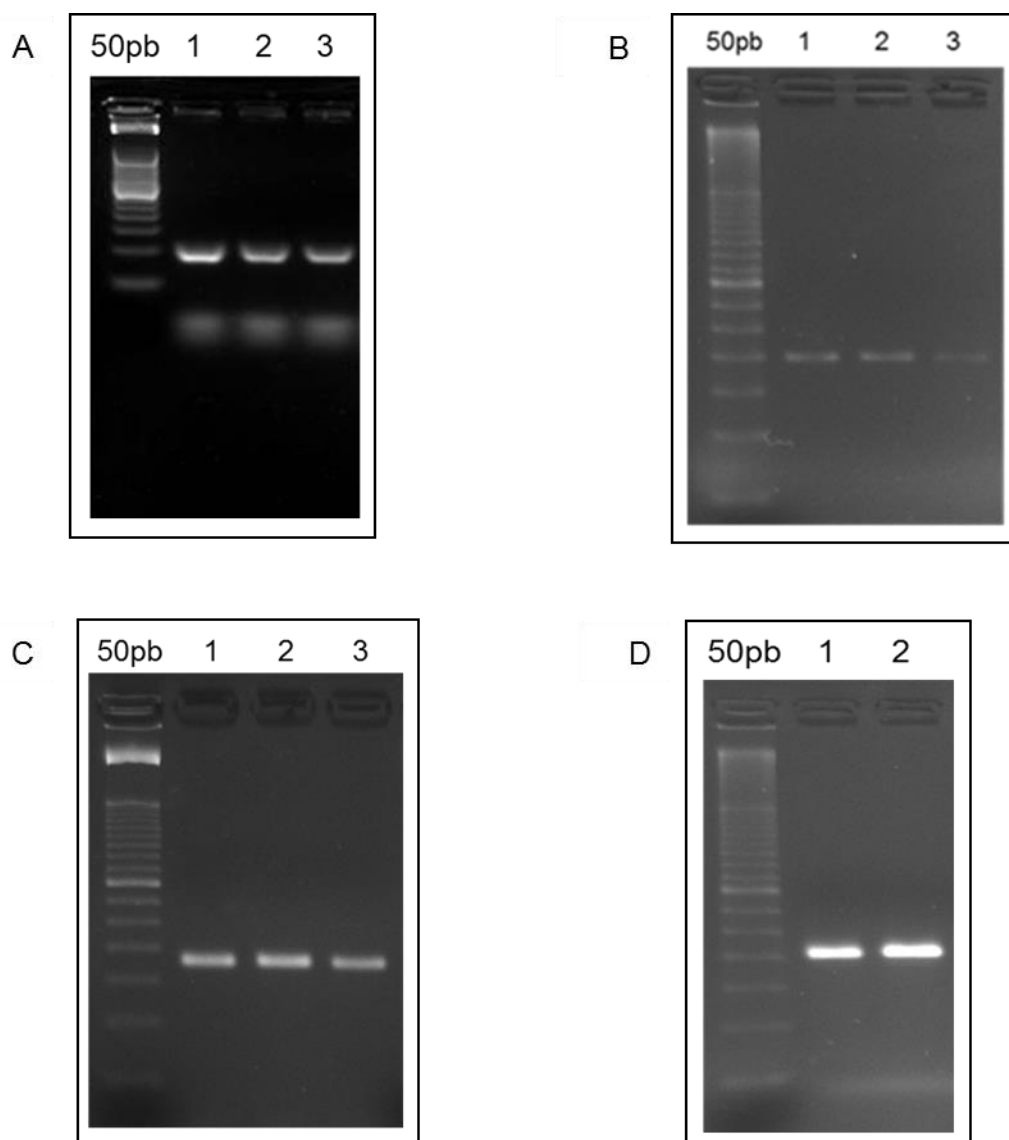
OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; HCV: Vírus da hepatite C; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*

4.3 Genotipagem dos polimorfismos -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP*

A genotipagem de cada polimorfismo no gene *MTTP* foi feita pelo método de PCR-RFLP, conforme descrito na seção Métodos. Após a extração e purificação do DNA de cada amostra, foi conduzida a PCR para a amplificação de fragmento de interesse que incluía a posição de cada polimorfismo estudado (**Figura 15**).

Figura 15 - Amostras representativas do padrão eletroforético de produtos de cada PCR. Padrão de peso molecular: 50 pb (pares de base)

A) Observação da banda de 109 pb para genotipagem do polimorfismo -493G/T no gene *MTTP*. B) Observação da banda de 199 pb para genotipagem do polimorfismo I128T no gene *MTTP*. C) Observação da banda de 183 pb para genotipagem do polimorfismo Q95H no gene *MTTP*. D) Observação da banda de 201 pb para genotipagem do polimorfismo Q244E no gene *MTTP*



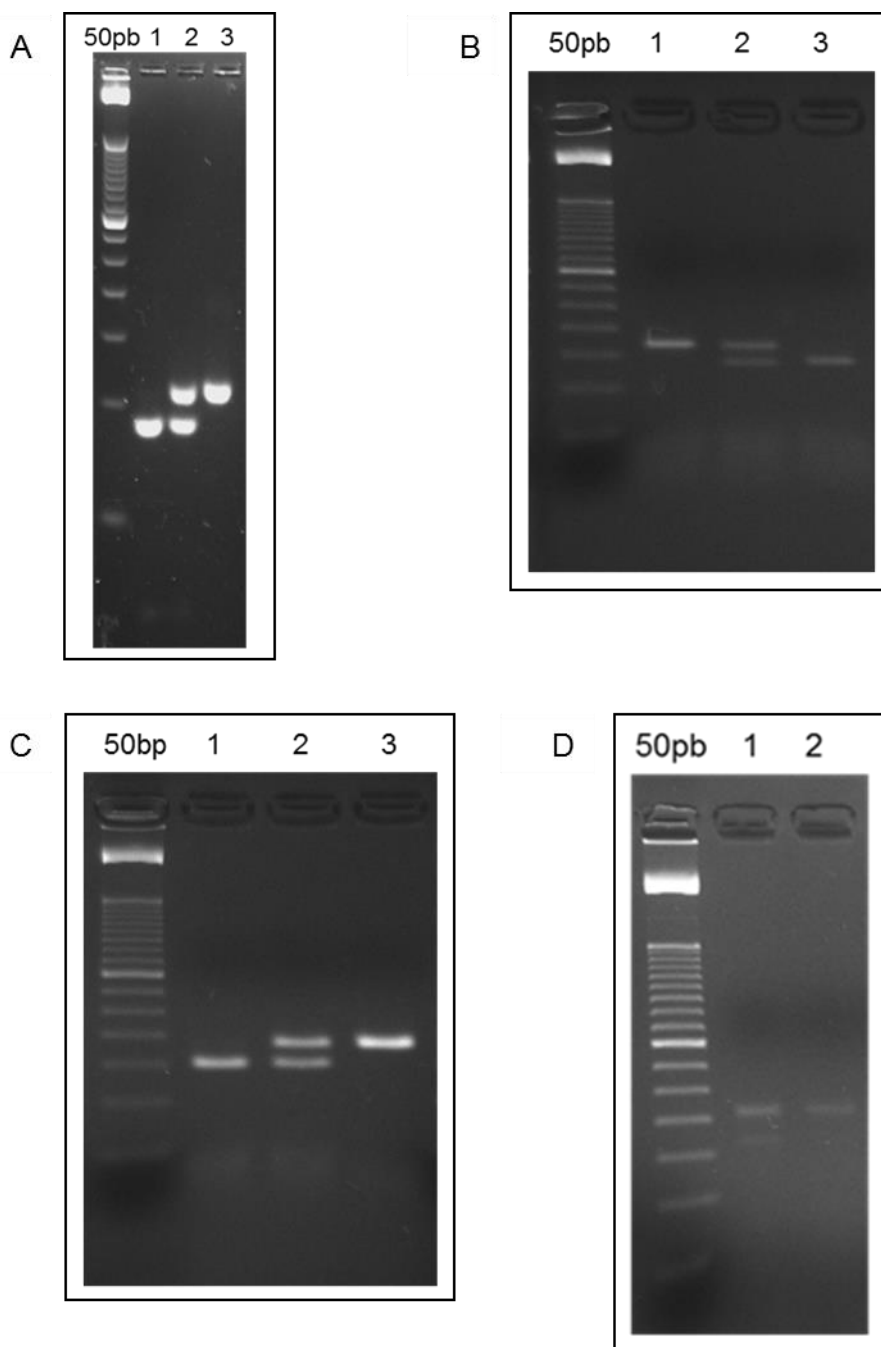
Fonte: obtido pelo autor usando o Fotodocumentador UVIdoc HD2.

Com a RFLP foram gerados perfis de fragmentos de DNA que possibilitaram a identificação dos possíveis genótipos de cada polimorfismo avaliados no gene *MTTP*: homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado.

Estão apresentados na **Figura 16** os perfis genotípicos de cada SNP estudado no gene *MTTP*. O SNP Q244E trata-se de um SNP encontrado em baixa frequência, essa pode ser a razão de não identificar nenhum indivíduo homozigoto mutado na população avaliada.

Figura 16 - Amostras representativas do padrão eletroforético de produtos de RFLP. Padrão de peso molecular: 50 pb (pares de base)

A) Representação dos genótipos do polimorfismo -493G/T no gene *MTTP*. 1) Homozigoto selvagem: GG. 2) Heterozigoto: GT. 3) Homozigoto mutado: TT. B) Representação dos genótipos do polimorfismo I128T no gene *MTTP*. 1) Homozigoto selvagem: II. 2) Heterozigoto: IT. 3) Homozigoto mutado: TT. C) Representação dos genótipos do polimorfismo Q95H no gene *MTTP*. 1) Homozigoto selvagem: QQ. 2) Heterozigoto: QH. 3) Homozigoto mutado: HH. D) Representação dos genótipos do polimorfismo Q244E no gene *MTTP*. 1) Heterozigoto: QE. 2) Homozigoto selvagem: QQ

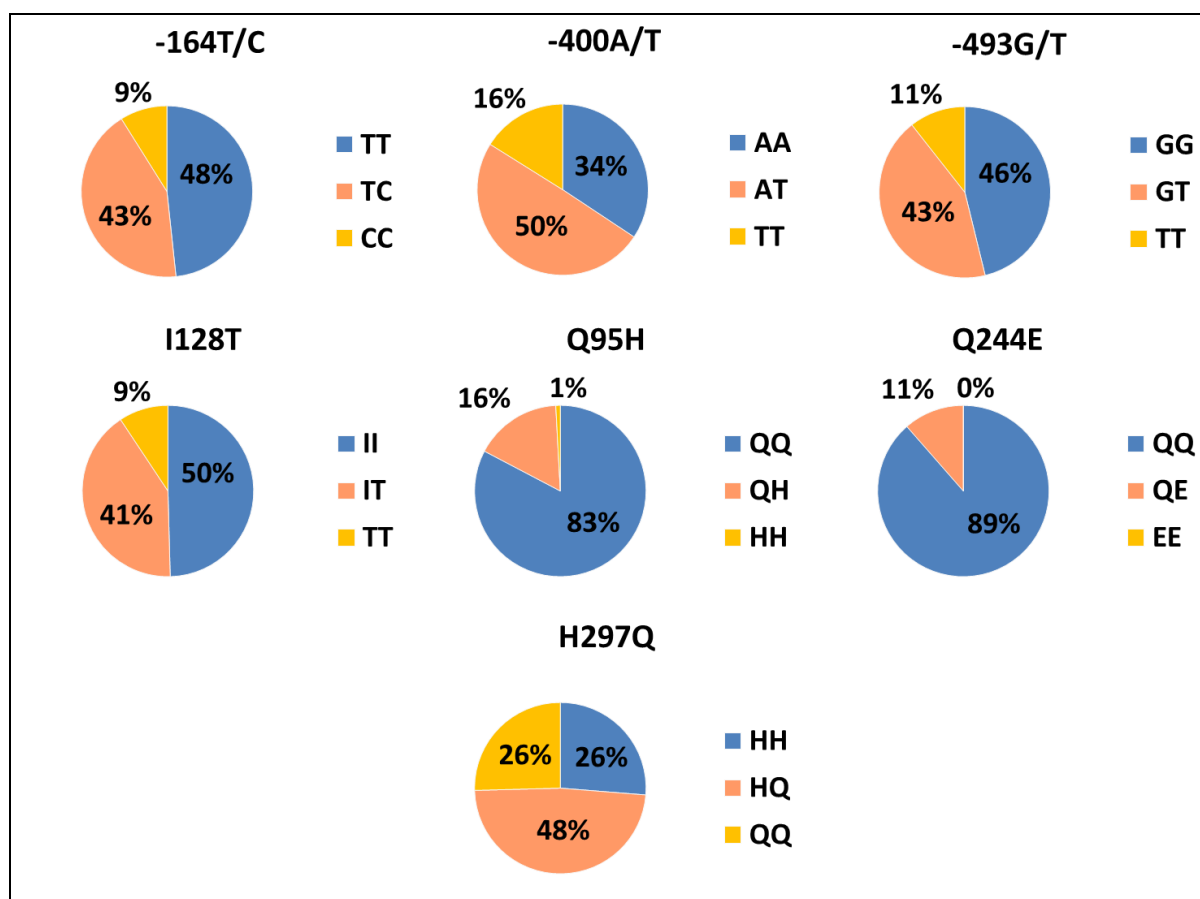


Fonte: obtido pelo autor usando o Fotodocumentador UVIdoc HD2.

4.4 Características genéticas dos polimorfismos no gene *MTTP* nos portadores crônicos do HCV - Grupo 1

Foi possível realizar a genotipagem dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E em todas as amostras incluídas no Grupo 1. O **Gráfico 2** apresenta a distribuição dos genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado) dos SNPs avaliados no gene *MTTP*.

Gráfico 2 - Frequência genotípica encontrada em cada SNP avaliado no gene *MTTP* nos 236 portadores crônicos do HCV



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Excel 2003.

Na **Tabela 13** é possível observar a frequência encontrada dos alelos mutados dos SNPs avaliados nos portadores crônicos do HCV. As distribuições dos genótipos dos SNPs no gene *MTTP* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$) nessa população estudada, ou seja, estão em equilíbrio genético.

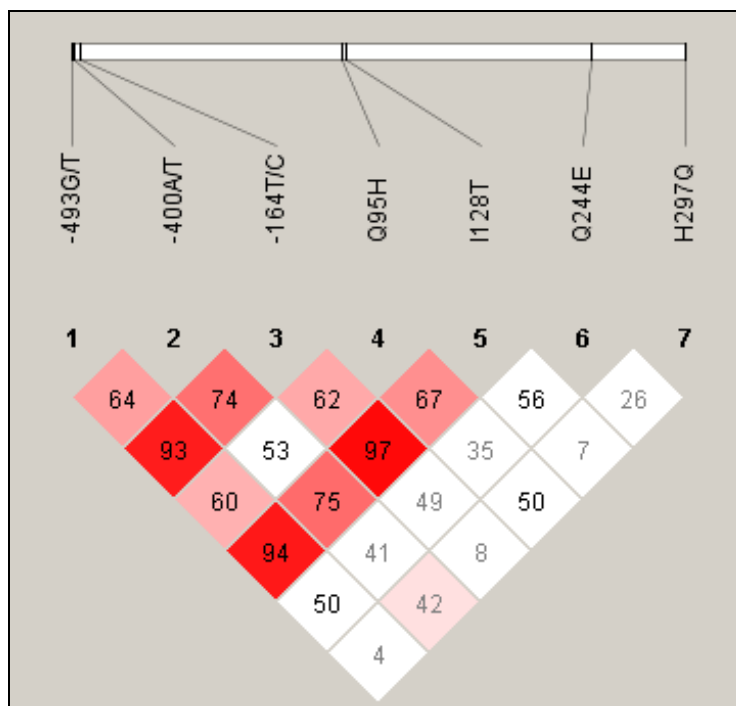
Tabela 13 - Frequência alélica encontrada em cada polimorfismo avaliado no gene *MTTP* nos 236 portadores crônicos do HCV e resultado do equilíbrio de Hardy-Weinberg

SNP gene <i>MTTP</i>	Frequência do alelo mutado	p
-164T/C	0,30	0,838
-400A/T	0,41	0,694
H297Q	0,50	0,603
-493G/T	0,32	0,875
I128T	0,30	0,770
Q95H	0,09	0,521
Q244E	0,06	0,351

Teste qui-quadrado

A análise do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos genéticos no gene *MTTP* revelou que três pares de SNPs apresentaram um alto DL, dentre eles o mais alto foi entre os SNPs -164T/C e I128T ($D':0,97$) (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 - Gráfico de desequilíbrio de ligação com base nos dados dos genótipos de sete SNPs no gene *MTTP* em portadores crônicos do HCV. Os valores de D' são indicados em cada quadrado; quanto mais intensa a cor vermelha maior o desequilíbrio de ligação

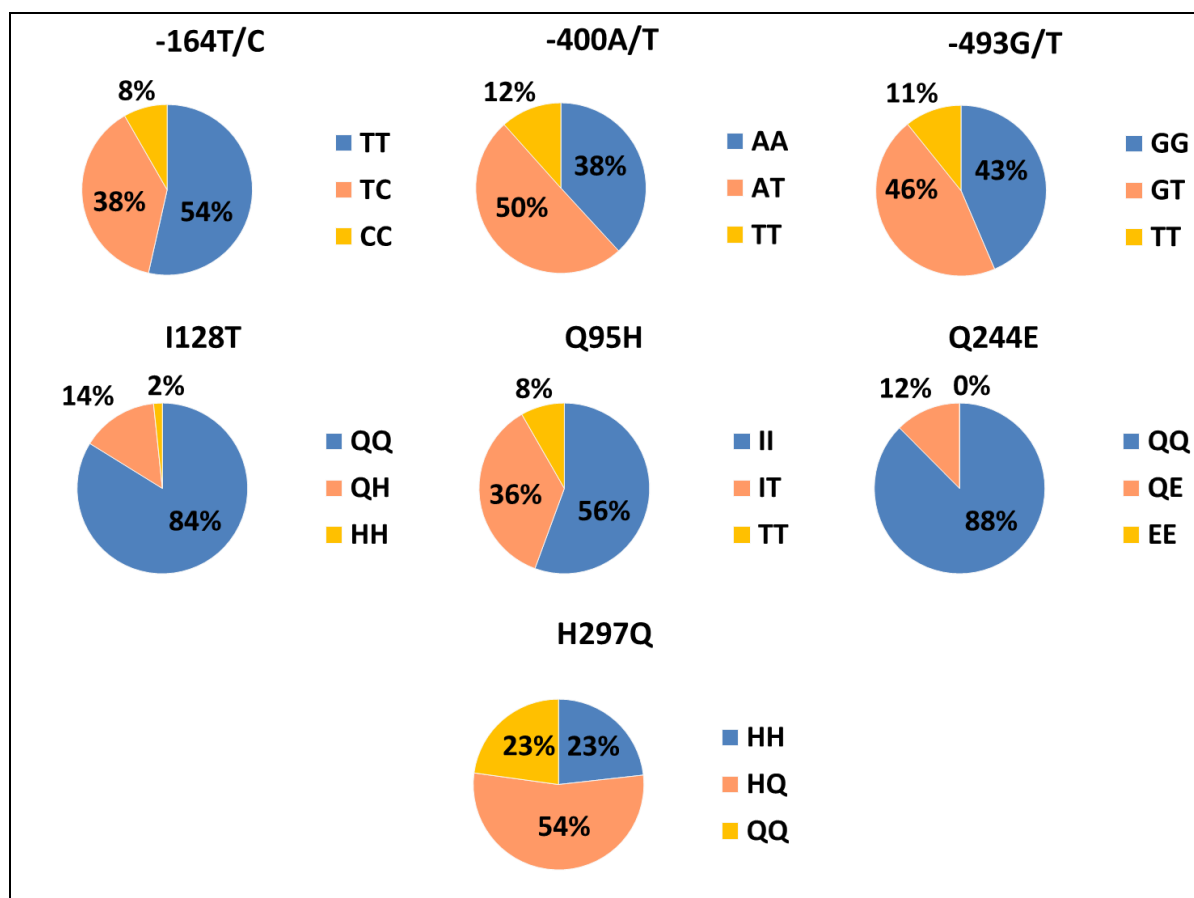


Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Haploview v.4.1.

4.5 Características genéticas dos polimorfismos no gene *MTTP* nos indivíduos saudáveis - Grupo 2

Foi possível realizar a genotipagem dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E em todas as amostras incluídas no Grupo 2. O **Gráfico 4** apresenta a distribuição dos genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado) dos SNPs avaliados no gene *MTTP*.

Gráfico 4 - Frequência genotípica encontrada em cada SNP avaliado no gene *MTTP* nos 241 indivíduos saudáveis



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Excel 2003.

Na **Tabela 14** é possível observar a frequência encontrada dos alelos mutados dos SNPs avaliados nos indivíduos saudáveis. As distribuições dos genótipos dos SNPs no gene *MTTP* nessa população investigada estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$).

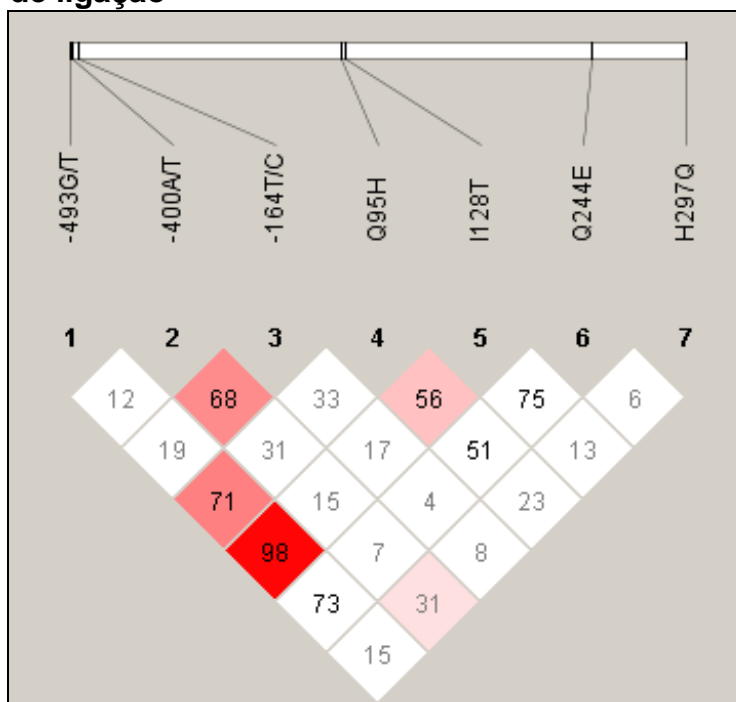
Tabela 14 - Frequência alélica encontrada em cada polimorfismo avaliado no gene *MTTP* nos 241 indivíduos saudáveis e resultado do equilíbrio de Hardy-Weinberg

SNP gene <i>MTTP</i>	Frequência do alelo mutado	p
-164T/C	0,27	0,532
-400A/T	0,37	0,212
H297Q	0,50	0,220
-493G/T	0,33	0,723
I128T	0,26	0,277
Q95H	0,09	0,098
Q244E	0,06	0,302

Teste qui-quadrado

A análise do desequilíbrio de ligação entre os sete polimorfismos genéticos no gene *MTTP*, nos indivíduos saudáveis, revelou que um par de SNPs apresentou alto DL, os SNPs -493G/T e I128T ($D':0,98$) (**Gráfico 5**).

Gráfico 5 - Gráfico de desequilíbrio de ligação com base nos dados dos genótipos de sete SNPs no gene *MTTP* em indivíduos saudáveis. Os valores de D' são indicados em cada quadrado; quanto mais intensa a cor vermelha maior o desequilíbrio de ligação



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Haploview v.4.1.

4.6 Comparação das características genéticas dos polimorfismos no gene *MTTP* entre os portadores crônicos do HCV (Grupo 1) e os indivíduos saudáveis (Grupo 2)

Na **Tabela 15** é possível observar que as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos no gene *MTTP* não foram significativamente diferentes entre os portadores crônicos do HCV e os indivíduos saudáveis ($p > 0,05$).

Tabela 15 - Comparação do número total de alelos e genótipos de cada polimorfismo no gene *MTTP* entre os portadores crônicos do HCV (Grupo 1) e os indivíduos saudáveis (Grupo 2)

SNP gene <i>MTTP</i>	Total	Grupo 1 – Portadores Crônicos do HCV n (%)	Grupo 2 – Indivíduos Saudáveis n (%)	p
-164T/C				
Alelo				0,321
T	679	329 (69,7)	350 (72,6)	
C	275	143 (30,3)	132 (27,4)	
Genótipo				0,517
TT	243	114 (48,3)	129 (53,5)	
TC	193	101 (42,8)	92 (38,2)	
CC	41	21 (8,9)	20 (8,3)	
-400A/T				
Alelo				0,186
A	584	279 (59,1)	305 (63,3)	
T	370	193 (40,9)	177 (36,7)	
Genótipo				0,327
AA	173	81 (34,3)	92 (38,2)	
AT	238	117 (49,6)	121(50,2)	
TT	66	38 (16,1)	28 (11,6)	
H297Q^a				
Alelo				0,845
C	480	238 (50,4)	242 (50,2)	
G	474	234 (49,6)	240 (49,8)	
Genótipo				0,459
HH	118	62 (26,3)	56 (23,2)	
HQ	244	114 (48,3)	130 (54,0)	
QQ	115	60 (25,4)	55 (22,8)	
-493G/T				
Alelo				0,192
G	640	320 (67,8)	320 (66,4)	
T	314	152 (32,2)	162 (33,6)	
Genótipo				0,842
GG	214	109 (46,2)	105 (43,6)	
GT	212	102 (43,2)	110 (45,6)	
TT	51	25 (10,6)	26 (10,8)	

Continua

Tabela 15 - Comparação do número total de alelos e genótipos de cada polimorfismo no gene *MTTP* entre os portadores crônicos do HCV (Grupo 1) e os indivíduos saudáveis (Grupo 2) (Conclusão)

SNP gene <i>MTTP</i>	Total	Grupo 1 – Portadores Crônicos do HCV n (%)	Grupo 2 – Indivíduos Saudáveis n (%)	p
I128T^b				
Alelo				0,225
T	686	331 (70,1)	355 (73,6)	
C	268	141 (29,9)	127 (26,4)	
Genótipo				0,419
II	251	117 (49,6)	134 (55,6)	
IT	184	97 (41,1)	87 (36,1)	
TT	42	22 (9,3)	20 (8,3)	
Q95H^c				
Alelo				0,898
G	870	431 (91,3)	439 (91,1)	
C	84	41 (8,7)	43 (8,9)	
Genótipo				0,357
QQ	398	196 (83,1)	202 (83,8)	
QH	74	39 (16,5)	35 (14,5)	
HH	5	1 (0,4)	4 (1,7)	
Q244E^d				
Alelo				0,742
C	897	445 (94,3)	452 (93,8)	
G	57	27 (5,7)	30 (6,2)	
Genótipo				0,734
QQ	420	209 (88,5)	211 (87,5)	
QE	57	27 (11,5)	30 (12,5)	
EE	0	0 (0,0)	0 (0,0)	

Teste qui-quadrado; ^a SNP H297Q: nucleotídeo C>G e aminoácido H>Q; ^b SNP I128T: nucleotídeo T>C e aminoácido I>T; ^c SNP Q95H: nucleotídeo G>C e aminoácido Q>H; ^d SNP Q244E: nucleotídeo C>G e aminoácido Q>E; Valor de p significativo: <0,05

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; HCV: Vírus da hepatite C

4.7 Características avaliadas em relação aos polimorfismos no gene *MTTP*

A seguir foram avaliadas as associações de diversos fatores relacionados à hepatite C crônica com os polimorfismos no gene *MTTP* estudados nos modelos codominante, dominante e recessivo.

4.7.1 Características avaliadas em relação ao polimorfismo -493G/T

Nas **Tabelas 16, 17 e 18** estão apresentados os resultados da associação das variáveis avaliadas nos portadores crônicos do HCV e o polimorfismo -493G/T no gene *MTTP* nos três modelos genéticos estudados. Idade mais avançada foi associada estatisticamente com esse SNP ($p < 0,05$).

Tabela 16 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -493G/T			p
	GG (n=109) n (%)	GT (n=102) n (%)	TT (n=25) n (%)	
Idade (anos)				0,008
<50	42 (38,5)	22 (21,6)	4 (16,0)	
≥50	67 (61,5)	80 (78,4)	21 (84,0)	
Sexo				0,889
Masculino	47 (43,1)	46 (45,1)	10 (40,0)	
Feminino	62 (56,9)	56 (54,9)	15 (60,0)	
Genótipo 3 HCV				0,245 ^a
Não	94 (86,2)	80 (78,4)	19 (76,0)	
Sim	15 (13,8)	22 (21,6)	6 (24,0)	
HOMA-IR				0,559
<3	72 (67,3)	66 (66,0)	14 (56,0)	
≥3	35 (32,7)	34 (34,0)	11 (44,0)	
ALT (U/L)				0,535
<41	48 (44,0)	44 (43,1)	8 (32,0)	
≥41	61 (56,0)	58 (56,9)	17 (68,0)	
AST (U/L)				0,334
<37	57 (52,3)	49 (48,0)	9 (36,0)	
≥37	52 (47,7)	53 (52,0)	16 (64,0)	
GGT (U/L)				0,904
<61	60 (55,0)	57 (55,9)	15 (60,0)	
≥61	49 (45,0)	45 (44,1)	10 (40,0)	
Ferro (µg/dL)				0,389
59-158	75 (70,1)	70 (68,6)	14 (56,0)	
>158	32 (29,9)	32 (31,4)	11 (44,0)	
Ferritina (ng/mL)				0,167
30-400	82 (75,9)	66 (64,7)	16 (64,0)	
>400	26 (24,1)	36 (35,3)	9 (36,0)	
Insulina (µU/mL)				0,084 ^a
<25	101 (94,4)	89 (89,0)	20 (80,0)	
≥25	6 (5,6)	11 (11,0)	5 (20,0)	
Glicose (mg/dL)				0,459
70-99	77 (70,6)	64 (62,7)	16 (64,0)	
>99	32 (29,4)	38 (37,3)	9 (36,0)	
Carga Viral (UI/ml)				0,431
<850.000	40 (37,7)	41 (41,8)	12 (52,2)	
≥850.000	66 (62,3)	57 (58,2)	11 (47,8)	
Fibrose				0,446
0-2	90 (82,6)	77 (75,5)	20 (80,0)	
3-4	19 (17,4)	25 (24,5)	5 (20,0)	
Siderose				0,789 ^a
Ausente	101 (92,7)	96 (94,1)	24 (96,0)	
Presente	8 (7,3)	6 (5,9)	1 (4,0)	

Continua

Tabela 16 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -493G/T			p
	GG (n=109) n (%)	GT (n=102) n (%)	TT (n=25) n (%)	
Atividade Inflamatória				0,852
0-1	39 (35,8)	33 (32,4)	8 (32,0)	
2-3	70 (64,2)	69 (67,6)	17 (68,0)	
Hipertensão Arterial				0,282
Não	75 (68,8)	61 (59,8)	14 (56,0)	
Sim	34 (31,2)	41 (40,2)	11 (44,0)	
Diabetes Mellitus				0,217 ^a
Não	97 (89,0)	82 (80,4)	21 (84,0)	
Sim	12 (11,0)	20 (19,6)	4 (16,0)	
Disfunção na Tireoide				0,834 ^a
Não	97 (89,0)	88 (86,3)	22 (88,0)	
Sim	12 (11,0)	14 (13,7)	3 (12,0)	
IMC				0,341
<25	37 (34,9)	44 (43,1)	11 (47,8)	
≥25	69 (65,1)	58 (56,9)	12 (52,2)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhança; Valor de p significativo: <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 17 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -493G/T		p
	GG (n=109) n (%)	GT/TT (n=127) n (%)	
Idade (anos)			0,002
<50	42 (38,5)	26 (20,5)	
≥50	67 (61,5)	101 (79,5)	
Sexo			0,880
Masculino	47 (43,1)	56 (44,1)	
Feminino	62 (56,9)	71 (55,9)	
Genótipo 3 HCV			0,100
Não	94 (86,2)	99 (78,0)	
Sim	15 (13,8)	28 (22,0)	
HOMA-IR			0,599
<3	72 (67,3)	80 (64,0)	
≥3	35 (32,7)	45 (36,0)	
ALT (U/L)			0,632
<41	48 (44,0)	52 (40,9)	
≥41	61 (56,0)	75 (59,1)	
AST (U/L)			0,310
<37	57 (52,3)	58 (45,7)	
≥37	52 (47,7)	69 (54,3)	
GGT (U/L)			0,799
<61	60 (55,0)	72 (56,7)	
≥61	49 (45,0)	55 (43,3)	
Ferro (µg/dL)			0,519
59-158	75 (70,1)	84 (66,1)	
>158	32 (29,9)	43 (33,9)	
Ferritina (ng/mL)			0,059
30-400	82 (75,9)	82 (64,6)	
>400	26 (24,1)	45 (35,4)	
Insulina (µU/mL)			0,062
<25	101 (94,4)	109 (87,2)	
≥25	6 (5,6)	16 (12,8)	
Glicose (mg/dL)			0,214
70-99	77 (70,6)	80 (63,0)	
>99	32 (29,4)	47 (37,0)	
Carga Viral (UI/ml)			0,354
<850.000	40 (37,7)	53 (43,8)	
≥850.000	66 (62,3)	68 (56,2)	
Fibrose			0,242
0-2	90 (82,6)	97 (76,4)	
3-4	19 (17,4)	30 (23,6)	
Siderose			0,566
Ausente	101 (92,7)	120 (94,5)	
Presente	8 (7,3)	7 (5,5)	

Continua

Tabela 17 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -493G/T		p
	GG (n=109) n (%)	GT/TT (n=127) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,572
0-1	39 (35,8)	41 (32,3)	
2-3	70 (64,2)	86 (67,7)	
Hipertensão Arterial			0,121
Não	75 (68,8)	75 (59,1)	
Sim	34 (31,2)	52 (40,9)	
Diabetes Mellitus			0,093
Não	97 (89,0)	103 (81,1)	
Sim	12 (11,0)	24 (18,9)	
Disfunção na Tireoide			0,579
Não	97 (89,0)	110 (86,6)	
Sim	12 (11,0)	17 (13,4)	
IMC			0,159
<25	37 (34,9)	55 (44,0)	
≥25	69 (65,1)	70 (56,0)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo: <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 18 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -493G/T		p
	GG/GT (n=211) n (%)	TT (n=25) n (%)	
Idade (anos)			0,135
<50	64 (30,3)	4 (16,0)	
≥50	147 (69,7)	21 (84,0)	
Sexo			0,698
Masculino	93 (44,1)	10 (40,0)	
Feminino	118 (55,9)	15 (60,0)	
Genótipo 3 HCV			0,417 ^a
Não	174 (82,5)	19 (76,0)	
Sim	37 (17,5)	6 (24,0)	
HOMA-IR			0,289
<3	138 (66,7)	14 (56,0)	
≥3	69 (33,3)	11 (44,0)	
ALT (U/L)			0,267
<41	92 (43,6)	8 (32,0)	
≥41	119 (56,4)	17 (68,0)	
AST (U/L)			0,178
<37	106 (50,2)	9 (36,0)	
≥37	105 (49,8)	16 (64,0)	
GGT (U/L)			0,665
<61	117 (55,5)	15 (60,0)	
≥61	94 (44,5)	10 (40,0)	
Ferro (µg/dL)			0,176
59-158	145 (69,4)	14 (56,0)	
>158	64 (30,6)	11 (44,0)	
Ferritina (ng/mL)			0,505
30-400	148 (70,5)	16 (64,0)	
>400	62 (29,5)	9 (36,0)	
Insulina (µU/mL)			0,070 ^a
<25	190 (91,8)	20 (80,0)	
≥25	17 (8,2)	5 (20,0)	
Glicose (mg/dL)			0,777
70-99	141 (66,8)	16 (64,0)	
>99	70 (33,2)	9 (36,0)	
Carga Viral (UI/ml)			0,249
<850.000	81 (39,7)	12 (52,2)	
≥850.000	123 (60,3)	11 (47,8)	
Fibrose			0,921
0-2	167 (79,1)	20 (80,0)	
3-4	44 (20,9)	5 (20,0)	
Siderose			>0,999 ^a
Ausente	197 (93,4)	24 (96,0)	
Presente	14 (6,6)	1 (4,0)	
Atividade Inflamatória			0,832
0-1	72 (34,1)	8 (32,0)	
2-3	139 (65,9)	17 (68,0)	

Continua

Tabela 18 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP -493G/T		p
	GG/GT (n=211) n (%)	TT (n=25) n (%)	
Hipertensão Arterial			0,406
Não	136 (64,5)	14 (56,0)	
Sim	75 (35,5)	11 (44,0)	
Diabetes Mellitus			>0,999 ^a
Não	179 (84,8)	21 (84,0)	
Sim	32 (15,2)	4 (16,0)	
Disfunção na Tireoide			>0,999 ^a
Não	185 (87,7)	22 (88,0)	
Sim	26 (12,3)	3 (12,0)	
IMC			0,409
<25	81 (38,9)	11 (47,8)	
≥25	127 (61,1)	12 (52,2)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo: <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

4.7.1.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo -493G/T

Nas **Tabelas 19, 20 e 21** estão apresentadas as análises de associação de diferentes modelos genéticos do polimorfismo -493G/T com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose. Nenhuma correlação foi verificada entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e a esteatose hepática com o SNP -493G/T nos portadores crônicos do HCV ($p>0,05$).

Tabela 19 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -493G/T			p
	GG (n=109) n (%)	GT (n=102) n (%)	TT (n=25) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)				0,781
<200	81 (74,3)	80 (78,4)	19 (76,0)	
≥200	28 (25,7)	22 (21,6)	6 (24,0)	
HDL (mg/dL)				0,846
>60	33 (30,3)	33 (32,4)	9 (36,0)	
≤60	76 (69,7)	69 (67,6)	16 (64,0)	
LDL (mg/dL)				0,617 ^a
<130	93 (85,3)	83 (81,4)	22 (88,0)	
≥130	16 (14,7)	19 (18,6)	3 (12,0)	
VLDL (mg/dL)				0,592 ^a
<40	102 (93,6)	96 (94,1)	22 (88,0)	
≥40	7 (6,4)	6 (5,9)	3 (12,0)	
Triglicerídeos (mg/dL)				0,479 ^a
<200	102 (93,6)	97 (95,1)	22 (88,0)	
≥200	7 (6,4)	5 (4,9)	3 (12,0)	
Esteatose				0,496
Ausente	52 (47,7)	50 (49,0)	9 (36,0)	
Presente	57 (52,3)	52 (51,0)	16 (64,0)	

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

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

Tabela 20 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -493G/T		p
	GG (n=109) n (%)	GT/TT (n=127) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)			0,512
<200	81 (74,3)	99 (78,0)	
≥200	28 (25,7)	28 (22,0)	
HDL (mg/dL)			0,646
>60	33 (30,3)	42 (33,1)	
≤60	76 (69,7)	85 (66,9)	
LDL (mg/dL)			0,582
<130	93 (85,3)	105 (82,7)	
≥130	16 (14,7)	22 (17,3)	
VLDL (mg/dL)			0,840
<40	102 (93,6)	118 (92,9)	
≥40	7 (6,4)	9 (7,1)	
Triglicerídeos (mg/dL)			0,969
<200	102 (93,6)	119 (93,7)	
≥200	7 (6,4)	8 (6,3)	
Esteatose			0,848
Ausente	52 (47,7)	59 (46,5)	
Presente	57 (52,3)	68 (53,5)	

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

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

Tabela 21 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP -493G/T		p
	GG/GT (n=211) n (%)	TT (n=25) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)			0,973
<200	161 (76,3)	19 (76,0)	
≥200	50 (23,7)	6 (24,0)	
HDL (mg/dL)			0,632
>60	66 (31,3)	9 (36,0)	
≤60	145 (68,7)	16 (64,0)	
LDL (mg/dL)			0,775 ^a
<130	176 (83,4)	22 (88,0)	
≥130	35 (16,6)	3 (12,0)	
VLDL (mg/dL)			0,389 ^a
<40	198 (93,8)	22 (88,0)	
≥40	13 (6,2)	3 (12,0)	
Triglicerídeos (mg/dL)			0,203 ^a
<200	199 (94,3)	22 (88,0)	
≥200	12 (5,7)	3 (12,0)	
Esteatose			0,242
Ausente	102 (48,3)	9 (36,0)	
Presente	109 (51,7)	16 (64,0)	

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

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

Na **Tabela 22** está demonstrada a avaliação da associação dos diferentes graus de esteatose hepática com o polimorfismo -493G/T em três diferentes modelos genéticos. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo -493G/T com os graus de esteatose nos portadores crônicos do HCV ($p>0,05$).

Tabela 22 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com os modelos codominante, dominante e recessivo do polimorfismo -493G/T e resultado dos testes de associação

SNP -493G/T	Esteatose			p
	Grau 0 n (%)	Grau 1 n (%)	Grau 2 e 3 n (%)	
Codominante				0,493 ^a
GG	52 (47,7)	45 (41,3)	12 (11,0)	
GT	50 (49,0)	37 (36,3)	15 (14,7)	
TT	9 (36,0)	10 (40,0)	6 (24,0)	
Dominante				0,455
GG	52 (47,7)	45 (41,3)	12 (11,0)	
GT/TT	59 (46,5)	47 (37,0)	21 (16,5)	
Recessivo				0,289 ^a
GG/GT	102 (48,3)	82 (38,9)	27 (12,8)	
TT	9 (36,0)	10 (40,0)	6 (24,0)	

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

A análise bivariada dos fatores que poderiam influenciar a presença de esteatose, juntamente com o SNP -493G/T no modelo dominante, estão apresentados na **Tabela 23**. Observa-se que a chance de desenvolver esteatose foi maior nos pacientes que carregavam o alelo mutado (T) do SNP -493G/T e possuíam infecção pelo genótipo 3 do HCV ($p=0,005$). Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 23 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo -493G/T no modelo dominante (GG vs GT/TT)

Variável	OR	IC 95%	p
Resultados SNP -493G/T	1,05	0,63-1,76	0,848
Idade (≥50 anos) X SNP -493G/T	1,16	0,36-3,78	0,803
Sexo (feminino) X SNP -493G/T	0,74	0,26-2,09	0,562
Genótipo 3 HCV X SNP -493G/T	9,74	2,02-46,90	0,005
ALT X SNP -493G/T	1,38	0,49-3,92	0,544
AST X SNP -493G/T	1,86	0,65-5,33	0,249
GGT X SNP -493G/T	1,93	0,68-5,50	0,219
Colesterol Total X SNP -493G/T	0,36	0,11-1,23	0,103
HDL X SNP -493G/T	0,67	0,22-2,02	0,472
LDL X SNP -493G/T	0,45	0,11-1,85	0,267
VLDL X SNP -493G/T	2,71	0,33-22,30	0,354
Triglicérides X SNP -493G/T	2,22	0,26-18,85	0,464
HOMA-IR X SNP -493G/T	0,87	0,28-2,64	0,800
Fibrose X SNP -493G/T	2,22	0,56-8,84	0,260
Atividade Inflamatória X SNP -493G/T	2,73	0,83-8,97	0,098
Siderose X SNP -493G/T	1,44	0,15-13,53	0,750
Hipertensão Arterial X SNP -493G/T	1,41	0,47-4,17	0,539
Diabetes Mellitus X SNP -493G/T	0,78	0,17-3,54	0,751
IMC X SNP -493G/T	1,05	0,36-3,04	0,935

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; 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, apresentada na **Tabela 24**, observou-se que a presença do alelo mutado (T) do SNP -493G/T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV aumentou em 11,51 vezes a chance de apresentar esteatose hepática (p=0,005). Nessa análise foram incluídas as variáveis associadas isoladamente com a esteatose nos portadores crônicos do HCV incluídos no presente estudo mais as interações que foram estatisticamente significativas na análise bivariada. Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 24 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo -493G/T com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV

Variável	OR	IC 95%	p
Sexo (feminino)	1,94	1,07-3,50	0,028
Genótipo 3 HCV	0,73	0,22-2,40	0,601
HOMA-IR (≥ 3)	1,87	1,01-3,47	0,048
Atividade Inflamatória (2-3)	4,75	2,51-8,97	<0,001
SNP -493G/T	0,66	0,35-1,24	0,193
SNP -493G/T x Genótipo 3 HCV	11,51	2,08-63,59	0,005

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

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

4.7.2 Características avaliadas em relação ao polimorfismo I128T

Nas **Tabelas 25, 26 e 27** estão apresentados os resultados da associação das variáveis avaliadas nos portadores crônicos do HCV e o polimorfismo I128T no gene *MTTP* nos três modelos genéticos estudados. Idade mais avançada, hipertensão arterial, níveis plasmáticos elevados de ferritina e de insulina foram associados com o SNP I128T ($p < 0,05$). Foi observado, também, associação de níveis elevados de insulina entre os indivíduos com o alelo mutado (T) do polimorfismo I128T nos três diferentes modelos genéticos ($p < 0,05$).

Tabela 25 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP I128T			p
	II (n=117) n (%)	IT (n=97) n (%)	TT (n=22) n (%)	
Idade (anos)				0,027
<50	43 (36,8)	21 (21,6)	4 (18,2)	
≥50	74 (63,2)	76 (78,4)	18 (81,8)	
Sexo				0,744
Masculino	51 (43,6)	44 (45,4)	8 (36,4)	
Feminino	66 (56,4)	53 (54,6)	14 (63,6)	
Genótipo 3 HCV				0,197 ^a
Não	101 (86,3)	75 (77,3)	17 (77,3)	
Sim	16 (13,7)	22 (22,7)	5 (22,7)	
HOMA-IR				0,485
<3	78 (67,8)	62 (65,3)	12 (54,5)	
≥3	37 (32,2)	33 (34,7)	10 (45,5)	
ALT (U/L)				0,504
<41	49 (41,9)	44 (45,4)	7 (31,8)	
≥41	68 (58,1)	53 (54,6)	15 (68,2)	
AST (U/L)				0,249
<37	59 (50,4)	49 (50,5)	7 (31,8)	
≥37	58 (49,6)	48 (49,5)	15 (68,2)	
GGT (U/L)				0,952
<61	65 (55,6)	54 (55,7)	13 (59,1)	
≥61	52 (44,4)	43 (44,3)	9 (40,9)	
Ferro (µg/dL)				0,162
59-158	81 (70,4)	67 (69,1)	11 (50,0)	
>158	34 (29,6)	30 (30,9)	11 (50,0)	
Ferritina (ng/mL)				0,116
30-400	88 (75,9)	63 (64,9)	13 (59,1)	
>400	28 (24,1)	34 (35,1)	9 (40,9)	
Insulina (µU/mL)				0,035^a
<25	109 (94,8)	84 (88,4)	17 (77,3)	
≥25	6 (5,2)	11 (11,6)	5 (22,7)	
Glicose (mg/dL)				0,929
70-99	79 (67,5)	64 (66,0)	14 (63,6)	
>99	38 (32,5)	33 (34,0)	8 (36,4)	
Carga Viral (UI/ml)				0,388
<850.000	44 (38,6)	38 (40,9)	11 (55,0)	
≥850.000	70 (61,4)	55 (59,1)	9 (45,0)	
Fibrose				0,378 ^a
0-2	97 (82,9)	73 (75,3)	17 (77,3)	
3-4	20 (17,1)	24 (24,7)	5 (22,7)	
Siderose				0,700 ^a
Ausente	108 (92,3)	92 (94,8)	21 (95,5)	
Presente	9 (7,7)	5 (5,2)	1 (4,5)	

Continua

Tabela 25 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP I128T			p
	II (n=117) n (%)	IT (n=97) n (%)	TT (n=22) n (%)	
Atividade Inflamatória				0,483
0-1	44 (37,6)	29 (29,9)	7 (31,8)	
2-3	73 (62,4)	68 (70,1)	15 (68,2)	
Hipertensão Arterial				0,052
Não	83 (70,9)	56 (57,7)	11 (50,0)	
Sim	34 (29,1)	41 (42,3)	11 (50,0)	
Diabetes Mellitus				0,585 ^a
Não	102 (87,2)	80 (82,5)	18 (81,8)	
Sim	15 (12,8)	17 (17,5)	4 (18,2)	
Disfunção na Tireoide				0,841 ^a
Não	103 (88,0)	84 (86,6)	20 (90,9)	
Sim	14 (12,0)	13 (13,4)	2 (9,1)	
IMC				0,524
<25	43 (37,1)	39 (41,1)	10 (50,0)	
≥25	73 (62,9)	56 (58,9)	10 (50,0)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhança; Valor de p significativo: <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 26 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP I128T		p
	II (n=117) n (%)	IT/TT (n=119) n (%)	
Idade (anos)			0,008
<50	43 (36,8)	25 (21,0)	
≥50	74 (63,2)	94 (79,0)	
Sexo			0,987
Masculino	51 (43,6)	52 (43,7)	
Feminino	66 (56,4)	67 (56,3)	
Genótipo 3 HCV			0,073
Não	101 (86,3)	92 (77,3)	
Sim	16 (13,7)	27 (22,7)	
HOMA-IR			0,463
<3	78 (67,8)	74 (63,2)	
≥3	37 (32,2)	43 (36,8)	
ALT (U/L)			0,879
<41	49 (41,9)	51 (42,9)	
≥41	68 (58,1)	68 (57,1)	
AST (U/L)			0,605
<37	59 (50,4)	56 (47,1)	
≥37	58 (49,6)	63 (52,9)	
GGT (U/L)			0,908
<61	65 (55,6)	67 (56,3)	
≥61	52 (44,4)	52 (43,7)	
Ferro (µg/dL)			0,423
59-158	81 (70,4)	78 (65,5)	
>158	34 (29,6)	41 (34,5)	
Ferritina (ng/mL)			0,045
30-400	88 (75,9)	76 (63,9)	
>400	28 (24,1)	43 (36,1)	
Insulina (µU/mL)			0,028
<25	109 (94,8)	101 (86,3)	
≥25	6 (5,2)	16 (13,7)	
Glicose (mg/dL)			0,748
70-99	79 (67,5)	78 (65,5)	
>99	38 (32,5)	41 (34,5)	
Carga Viral (UI/ml)			0,465
<850.000	44 (38,6)	49 (43,4)	
≥850.000	70 (61,4)	64 (56,6)	
Fibrose			0,168
0-2	97 (82,9)	90 (75,6)	
3-4	20 (17,1)	29 (24,4)	
Siderose			0,404
Ausente	108 (92,3)	113 (95,0)	
Presente	9 (7,7)	6 (5,0)	

Continua

Tabela 26 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP I128T		p
	II (n=117) n (%)	IT/TT (n=119) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,233
0-1	44 (37,6)	36 (30,3)	
2-3	73 (62,4)	83 (69,7)	
Hipertensão Arterial			0,019
Não	83 (70,9)	67 (56,3)	
Sim	34 (29,1)	52 (43,7)	
Diabetes Mellitus			0,303
Não	102 (87,2)	98 (82,4)	
Sim	15 (12,8)	21 (17,6)	
Disfunção na Tireoide			0,881
Não	103 (88,0)	104 (87,4)	
Sim	14 (12,0)	15 (12,6)	
IMC			0,390
<25	43 (37,1)	49 (42,6)	
≥25	73 (62,9)	66 (57,4)	

Teste qui-quadrado; Valor de p significativo: <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 27 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP I128T		p
	II/IT (n=214) n (%)	TT (n=22) n (%)	
Idade (anos)			0,248
<50	64 (29,9)	4 (18,2)	
≥50	150 (70,1)	18 (81,8)	
Sexo			0,470
Masculino	95 (44,4)	8 (36,4)	
Feminino	119 (55,6)	14 (63,6)	
Genótipo 3 HCV			0,565 ^a
Não	176 (82,2)	17 (77,3)	
Sim	38 (17,8)	5 (22,7)	
HOMA-IR			0,255
<3	140 (66,7)	12 (54,5)	
≥3	70 (33,3)	10 (45,5)	
ALT (U/L)			0,293
<41	93 (43,5)	7 (31,8)	
≥41	121 (56,5)	15 (68,2)	
AST (U/L)			0,096
<37	108 (50,5)	7 (31,8)	
≥37	106 (49,5)	15 (68,2)	
GGT (U/L)			0,754
<61	119 (55,6)	13 (59,1)	
≥61	95 (44,4)	9 (40,9)	
Ferro (µg/dL)			0,058
59-158	148 (69,8)	11 (50,0)	
>158	64 (30,2)	11 (50,0)	
Ferritina (ng/mL)			0,251
30-400	151 (70,9)	13 (59,1)	
>400	62 (29,1)	9 (40,9)	
Insulina (µU/mL)			0,043^a
<25	193 (91,9)	17 (77,3)	
≥25	17 (8,1)	5 (22,7)	
Glicose (mg/dL)			0,763
70-99	143 (66,8)	14 (63,6)	
>99	71 (33,2)	8 (36,4)	
Carga Viral (UI/ml)			0,181
<850.000	82 (39,6)	11 (55,0)	
≥850.000	125 (60,4)	9 (45,0)	
Fibrose			0,786 ^a
0-2	170 (79,4)	17 (77,3)	
3-4	44 (20,6)	5 (22,7)	
Siderose			>0,999 ^a
Ausente	200 (93,5)	21 (95,5)	
Presente	14 (6,5)	1 (4,5)	
Atividade Inflamatória			0,829
0-1	73 (34,1)	7 (31,8)	
2-3	141 (65,9)	15 (68,2)	

Continua

Tabela 27 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP I128T		p
	II/IT (n=214) n (%)	TT (n=22) n (%)	
Hipertensão Arterial			0,165
Não	139 (65,0)	11 (50,0)	
Sim	75 (35,0)	11 (50,0)	
Diabetes Mellitus			0,754 ^a
Não	182 (85,0)	18 (81,8)	
Sim	32 (15,0)	4 (18,2)	
Disfunção na Tireoide			>0,999 ^a
Não	187 (87,4)	20 (90,9)	
Sim	27 (12,6)	2 (9,1)	
IMC			0,331
<25	82 (38,9)	10 (50,0)	
≥25	129 (61,1)	10 (50,0)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo: <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

4.7.2.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo I128T

Nas **Tabelas 28, 29 e 30** estão apresentadas as análises de associação de diferentes modelos genéticos do polimorfismo I128T com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose. Nenhuma correlação foi verificada entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e a esteatose hepática com o SNP I128T nos portadores crônicos do HCV ($p>0,05$).

Tabela 28 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP I128T			p
	II (n=117) n (%)	IT (n=97) n (%)	TT (n=22) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)				0,599
<200	86 (73,5)	77 (79,4)	17 (77,3)	
≥200	31 (26,5)	20 (20,6)	5 (22,7)	
HDL (mg/dL)				0,819
>60	38 (32,5)	29 (29,9)	8 (36,4)	
≤60	79 (67,5)	68 (70,1)	14 (63,6)	
LDL (mg/dL)				0,865 ^a
<130	99 (84,6)	80 (82,5)	19 (86,4)	
≥130	18 (15,4)	17 (17,5)	3 (13,6)	
VLDL (mg/dL)				0,480 ^a
<40	110 (94,0)	91 (93,8)	19 (86,4)	
≥40	7 (6,0)	6 (6,2)	3 (13,6)	
Triglicerídeos (mg/dL)				0,410 ^a
<200	110 (94,0)	92 (94,8)	19 (86,4)	
≥200	7 (6,0)	5 (5,2)	3 (13,6)	
Esteatose				0,139
Ausente	56 (47,9)	49 (50,5)	6 (27,3)	
Presente	61 (52,1)	48 (49,5)	16 (72,7)	

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

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

Tabela 29 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP I128T		p
	II (n=117) n (%)	IT/TT (n=119) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)			0,322
<200	86 (73,5)	94 (79,0)	
≥200	31 (26,5)	25 (21,0)	
HDL (mg/dL)			0,819
>60	38 (32,5)	37 (31,1)	
≤60	79 (67,5)	82 (68,9)	
LDL (mg/dL)			0,766
<130	99 (84,6)	99 (83,2)	
≥130	18 (15,4)	20 (16,8)	
VLDL (mg/dL)			0,629
<40	110 (94,0)	110 (92,4)	
≥40	7 (6,0)	9 (7,6)	
Triglicerídeos (mg/dL)			0,816
<200	110 (94,0)	111 (93,3)	
≥200	7 (6,0)	8 (6,7)	
Esteatose			0,800
Ausente	56 (47,9)	55 (46,2)	
Presente	61 (52,1)	64 (53,8)	

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

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

Tabela 30 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP I128T		p
	II/IT (n=214) n (%)	TT (n=22) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)			0,908
<200	163 (76,2)	17 (77,3)	
≥200	51 (23,8)	5 (22,7)	
HDL (mg/dL)			0,628
>60	67 (31,3)	8 (36,4)	
≤60	147 (68,7)	14 (63,6)	
LDL (mg/dL)			>0,999 ^a
<130	179 (83,6)	19 (86,4)	
≥130	35 (16,4)	3 (13,6)	
VLDL (mg/dL)			0,177 ^a
<40	201 (93,9)	19 (86,4)	
≥40	13 (6,1)	3 (13,6)	
Triglicerídeos (mg/dL)			0,153 ^a
<200	202 (94,4)	19 (86,4)	
≥200	12 (5,6)	3 (13,6)	
Esteatose			0,051
Ausente	105 (49,1)	6 (27,3)	
Presente	109 (50,9)	16 (72,7)	

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

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

Na **Tabela 31** está demonstrada a avaliação da associação dos diferentes graus de esteatose hepática com o polimorfismo I128T em três diferentes modelos genéticos. Foi observada associação estatisticamente significante entre o polimorfismo I128T com os graus 2 e 3 de esteatose no modelo recessivo nos portadores crônicos do HCV (p=0,038).

Tabela 31 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com os modelos codominante, dominante e recessivo do polimorfismo I128T e resultado dos testes de associação

SNP I128T	Esteatose			p
	Grau 0 n (%)	Grau 1 n (%)	Grau 2 e 3 n (%)	
Codominante				0,090 ^a
II	56 (47,9)	49 (41,9)	12 (10,3)	
IT	49 (50,5)	34 (35,1)	14 (14,4)	
TT	6 (27,3)	9 (40,9)	7 (31,8)	
Dominante				0,242
II	56 (47,9)	49 (41,9)	12 (10,3)	
IT/TT	55 (46,2)	43 (36,1)	21 (17,6)	
Recessivo				0,038^a
II/IT	105 (49,1)	83 (38,8)	26 (12,1)	
TT	6 (27,3)	9 (40,9)	7 (31,8)	

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

A análise bivariada dos fatores que poderiam influenciar a presença de esteatose, juntamente com o SNP I128T no modelo dominante, está apresentada na **Tabela 32**. Observa-se que a chance de desenvolver esteatose foi maior nos pacientes que carregavam o alelo mutado (T) do SNP I128T e possuíam infecção pelo genótipo 3 do HCV ($p=0,009$). Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 32 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo I128T no modelo dominante (II vs IT/TT)

Variável	OR	IC 95%	p
Resultados SNP I128T	1,07	0,64-1,78	0,800
Idade (≥50 anos) X SNP I128T	1,51	0,46-4,96	0,495
Sexo (feminino) X SNP I128T	0,79	0,28-2,23	0,657
Genótipo 3 HCV X SNP I128T	7,90	1,67-37,29	0,009
ALT X SNP I128T	0,97	0,34-2,76	0,960
AST X SNP I128T	1,20	0,42-3,43	0,732
GGT X SNP I128T	2,39	0,83-6,82	0,105
Colesterol Total X SNP I128T	0,44	0,13-1,48	0,184
HDL X SNP I128T	0,74	0,24-2,22	0,588
LDL X SNP I128T	0,44	0,11-1,78	0,246
VLDL X SNP I128T	2,67	0,32-21,94	0,362
Triglicerídeos X SNP I128T	2,19	0,26-18,52	0,474
HOMA-IR X SNP I128T	0,93	0,31-2,82	0,897
Fibrose X SNP I128T	1,90	0,48-7,51	0,363
Atividade Inflamatória X SNP I128T	1,52	0,46-4,98	0,488
Siderose X SNP I128T	0,92	0,10-8,73	0,940
Hipertensão Arterial X SNP I128T	1,42	0,48-4,20	0,532
Diabetes Mellitus X SNP I128T	1,12	0,26-4,73	0,881
IMC X SNP I128T	0,96	0,33-2,76	0,935

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; 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, apresentada na **Tabela 33**, observou-se que a presença do alelo mutado (T) do SNP I128T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV aumenta em 8,51 vezes a chance de apresentar esteatose hepática (p=0,012). Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 33 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo I128T com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV

Variável	OR	IC 95%	p
Sexo (feminino)	1,99	1,11-3,59	0,022
Genótipo 3 HCV	0,91	0,29-2,88	0,877
HOMA-IR (≥ 3)	1,84	0,99-3,41	0,053
Atividade Inflamatória (2-3)	4,67	2,48-8,79	<0,001
SNP I128T	0,64	0,34-1,20	0,166
SNP I128T x Genótipo 3 HCV	8,51	1,59-45,54	0,012

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

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

4.7.3 Características avaliadas em relação ao polimorfismo Q95H

Para o polimorfismo Q95H foi avaliada a associação de diversos fatores relacionados à hepatite C crônica em dois diferentes modelos genéticos, pois para esse polimorfismo foi detectada a presença do homozigoto mutado em somente um portador crônico do HCV. Desse modo não foi possível realizar a análise estatística com o modelo recessivo, isto é, o homozigoto selvagem mais o heterozigoto versus o homozigoto mutado.

Nas **Tabelas 34 e 35** estão apresentados os resultados da associação das variáveis avaliadas nos portadores crônicos do HCV e o polimorfismo Q95H no gene *MTTP* nos dois modelos genéticos estudados. Idade mais avançada e níveis plasmáticos elevados de insulina foram associados com o SNP Q95H ($p < 0,05$). Foi observado, também, associação de níveis elevados de insulina entre os indivíduos com o alelo mutado (H) do polimorfismo Q95H nos dois diferentes modelos genéticos estudados ($p = 0,011$ e $p = 0,014$).

Tabela 34 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP Q95H			p
	QQ (n=196) n (%)	QH (n=39) n (%)	HH (n=1) n (%)	
Idade (anos)				0,032^a
<50	61 (31,1)	6 (15,4)	1 (100,0)	
≥50	135 (68,9)	33 (84,6)	0 (0,0)	
Sexo				0,405 ^a
Masculino	84 (42,9)	18 (46,2)	1 (100,0)	
Feminino	112 (57,1)	21 (53,8)	0 (0,0)	
Genótipo 3 HCV				0,372 ^a
Não	163 (83,2)	29 (74,4)	1 (100,0)	
Sim	33 (16,8)	10 (25,6)	0 (0,0)	
HOMA-IR				0,234 ^a
<3	130 (67,0)	22 (59,5)	0 (0,0)	
≥3	64 (33,0)	15 (40,5)	1 (100,0)	
ALT (U/L)				0,563 ^a
<41	84 (42,9)	16 (41,0)	0 (0,0)	
≥41	112 (57,1)	23 (59,0)	1 (100,0)	
AST (U/L)				0,182 ^a
<37	100 (51,0)	15 (38,5)	0 (0,0)	
≥37	96 (49,0)	24 (61,5)	1 (100,0)	
GGT (U/L)				0,171 ^a
<61	114 (58,2)	18 (46,2)	0 (0,0)	
≥61	82 (41,8)	21 (53,8)	1 (100,0)	
Ferro (µg/dL)				0,587 ^a
59-158	133 (68,6)	25 (64,1)	1 (100,0)	
>158	61 (31,4)	14 (35,9)	0 (0,0)	
Ferritina (ng/mL)				0,110 ^a
30-400	141 (72,3)	22 (56,4)	1 (100,0)	
>400	54 (27,7)	17 (43,6)	0 (0,0)	
Insulina (µU/mL)				0,011^a
<25	180 (92,8)	30 (81,1)	0 (0,0)	
≥25	14 (7,2)	7 (18,9)	1 (100,0)	
Glicose (mg/dL)				0,630 ^a
70-99	131 (66,8)	25 (64,1)	1 (100,0)	
>99	65 (33,2)	14 (35,9)	0 (0,0)	
Carga Viral (UI/ml)				0,571
<850.000	79 (41,8)	14 (36,8)	0 (0,0)	
≥850.000	110 (58,2)	24 (63,2)	0 (0,0)	
Fibrose				0,385 ^a
0-2	158 (80,6)	28 (71,8)	1 (100,0)	
3-4	38 (19,4)	11 (28,2)	0 (0,0)	
Siderose				0,877 ^a
Ausente	183 (93,4)	37 (94,9)	1 (100,0)	
Presente	13 (6,6)	2 (5,1)	0 (0,0)	

Continua

Tabela 34 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo codominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP Q95H			p
	QQ (n=196) n (%)	QH (n=39) n (%)	HH (n=1) n (%)	
Atividade Inflamatória				0,169 ^a
0-1	69 (35,2)	10 (25,6)	1 (100,0)	
2-3	127 (64,8)	29 (74,4)	0 (0,0)	
Hipertensão Arterial				0,077 ^a
Não	130 (66,3)	19 (48,7)	1 (100,0)	
Sim	66 (33,7)	20 (51,3)	0 (0,0)	
Diabetes Mellitus				0,751 ^a
Não	167 (85,2)	32 (82,1)	1 (100,0)	
Sim	29 (14,8)	7 (17,9)	0 (0,0)	
Disfunção na Tireoide				0,795 ^a
Não	171 (87,2)	35 (89,7)	1 (100,0)	
Sim	25 (12,8)	4 (10,3)	0 (0,0)	
IMC				0,587 ^a
<25	77 (40,3)	15 (38,5)	0 (0,0)	
≥25	114 (59,7)	24 (61,5)	1 (100,0)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste da razão de verossimilhança; Valor de p significativo: <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 35 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP Q95H		p
	QQ (n=196) n (%)	QH/HH (n=40) n (%)	
Idade (anos)			0,083
<50	61 (31,1)	7 (17,5)	
≥50	135 (68,9)	33 (82,5)	
Sexo			0,589
Masculino	84 (42,9)	19 (47,5)	
Feminino	112 (57,1)	21 (52,5)	
Genótipo 3 HCV			0,223
Não	163 (83,2)	30 (75,0)	
Sim	33 (16,8)	10 (25,0)	
HOMA-IR			0,280
<3	130 (67,0)	22 (57,9)	
≥3	64 (33,0)	16 (42,1)	
ALT (U/L)			0,739
<41	84 (42,9)	16 (40,0)	
≥41	112 (57,1)	24 (60,0)	
AST (U/L)			0,119
<37	100 (51,0)	15 (37,5)	
≥37	96 (49,0)	25 (62,5)	
GGT (U/L)			0,126
<61	114 (58,2)	18 (45,0)	
≥61	82 (41,8)	22 (55,0)	
Ferro (µg/dL)			0,661
59-158	133 (68,6)	26 (65,0)	
>158	61 (31,4)	14 (35,0)	
Ferritina (ng/mL)			0,063
30-400	141 (72,3)	23 (57,5)	
>400	54 (27,7)	17 (42,5)	
Insulina (µU/mL)			0,014^a
<25	180 (92,8)	30 (78,9)	
≥25	14 (7,2)	8 (21,1)	
Glicose (mg/dL)			0,822
70-99	131 (66,8)	26 (65,0)	
>99	65 (33,2)	14 (35,0)	
Carga Viral (UI/ml)			0,571
<850.000	79 (41,8)	14 (36,8)	
≥850.000	110 (58,2)	24 (63,2)	
Fibrose			0,249
0-2	158 (80,6)	29 (72,5)	
3-4	38 (19,4)	11 (27,5)	
Siderose			>0,999 ^a
Ausente	183 (93,4)	38 (95,0)	
Presente	13 (6,6)	2 (5,0)	

Continua

Tabela 35 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP Q95H		p
	QQ (n=196) n (%)	QH/HH (n=40) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,348
0-1	69 (35,2)	11 (27,5)	
2-3	127 (64,8)	29 (72,5)	
Hipertensão Arterial			0,051
Não	130 (66,3)	20 (50,0)	
Sim	66 (33,7)	20 (50,0)	
Diabetes Mellitus			0,665
Não	167 (85,2)	33 (82,5)	
Sim	29 (14,8)	7 (17,5)	
Disfunção na Tireoide			0,794 ^a
Não	171 (87,2)	36 (90,0)	
Sim	25 (12,8)	4 (10,0)	
IMC			0,741
<25	77 (40,3)	15 (37,5)	
≥25	114 (59,7)	25 (62,5)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo: <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

4.7.3.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo Q95H

Nas **Tabelas 36 e 37** estão apresentadas as análises de associação dos modelos genéticos codominante e dominante do polimorfismo Q95H com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose. Nenhuma correlação foi verificada entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e com o polimorfismo Q95H nos portadores crônicos do HCV ($p > 0,05$). Entretanto, a presença de esteatose foi associada com o SNP Q95H no modelo dominante ($p = 0,043$).

Tabela 36 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com modelo codominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP Q95H			p
	QQ (n=196) n (%)	QH (n=39) n (%)	HH (n=1) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)				0,157
<200	148 (75,5)	32 (82,1)	0 (0,0)	
≥200	48 (24,5)	7 (17,9)	1 (100,0)	
HDL (mg/dL)				0,440
>60	65 (33,2)	10 (25,6)	0 (0,0)	
≤60	131 (66,8)	29 (74,4)	1 (100,0)	
LDL (mg/dL)				0,136
<130	164 (83,7)	34 (87,2)	0 (0,0)	
≥130	32 (16,3)	5 (12,8)	1 (100,0)	
VLDL (mg/dL)				0,301
<40	185 (94,4)	34 (87,2)	1 (100,0)	
≥40	11 (5,6)	5 (12,8)	0 (0,0)	
Triglicerídeos (mg/dL)				0,242
<200	186 (94,9)	34 (87,2)	1 (100,0)	
≥200	10 (5,1)	5 (12,8)	0 (0,0)	
Esteatose				0,083
Ausente	98 (50,0)	13 (33,3)	0 (0,0)	
Presente	98 (50,0)	26 (66,7)	1 (100,0)	

Teste da razão de verossimilhança; Valor de p significativo: <0,05

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

Tabela 37 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP Q95H		p
	QQ (n=196) n (%)	QH/HH (n=40) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)			0,543
<200	148 (75,5)	32 (80,0)	
≥200	48 (24,5)	8 (20,0)	
HDL (mg/dL)			0,312
>60	65 (33,2)	10 (25,0)	
≤60	131 (66,8)	30 (75,0)	
LDL (mg/dL)			0,835
<130	164 (83,7)	34 (85,0)	
≥130	32 (16,3)	6 (15,0)	
VLDL (mg/dL)			0,158 ^a
<40	185 (94,4)	35 (87,5)	
≥40	11 (5,6)	5 (12,5)	
Triglicerídeos (mg/dL)			0,144 ^a
<200	186 (94,9)	35 (87,5)	
≥200	10 (5,1)	5 (12,5)	
Esteatose			0,043
Ausente	98 (50,0)	13 (32,5)	
Presente	98 (50,0)	27 (67,5)	

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

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

Na **Tabela 38** está demonstrada a avaliação da associação dos diferentes graus de esteatose hepática com o polimorfismo Q95H nos modelos codominante e dominante. Não foi observada associação estatisticamente significante entre o polimorfismo Q95H com os graus de esteatose nos portadores crônicos do HCV incluídos no estudo.

Tabela 38 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com o modelo codominante e modelo dominante do polimorfismo Q95H e resultado dos testes de associação

SNP Q95H	Esteatose			p
	Grau 0 n (%)	Grau 1 n (%)	Grau 2 e 3 n (%)	
Codominante				0,089 ^a
QQ	98 (50,0)	74 (37,8)	24 (12,2)	
QH	13 (33,3)	18 (46,2)	8 (20,5)	
HH	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
Dominante				0,078
QQ	98 (50,0)	74 (37,8)	24 (12,2)	
QH/HH	13 (32,5)	18 (45,0)	9 (22,5)	

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

A análise bivariada dos fatores que poderiam influenciar a presença de esteatose juntamente com o SNP Q95H no modelo dominante estão apresentados na **Tabela 39**. Observa-se que a chance de desenvolver esteatose foi maior nos pacientes que carregavam o alelo mutado (H) do SNP Q95H e possuíam um aumento do IMC. Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 39 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo Q95H no modelo dominante (QQ vs QH/HH)

Variável	OR	IC 95%	p
Resultados SNP Q95H	2,08	1,01-4,26	0,046
Idade (≥50 anos) X SNP Q95H	0,92	0,16-5,47	0,929
Sexo (feminino) X SNP Q95H	1,41	0,32-6,13	0,649
Genótipo 3 HCV X SNP Q95H	0,36	0,06-2,11	0,259
ALT X SNP Q95H	0,88	0,21-3,79	0,865
AST X SNP Q95H	1,21	0,28-5,33	0,801
GGT X SNP Q95H	0,59	0,14-2,52	0,479
Colesterol Total X SNP Q95H	1,76	0,27-11,45	0,557
HDL X SNP Q95H	0,50	0,08-3,06	0,450
LDL X SNP Q95H	1,29	0,18-9,49	0,802
VLDL X SNP Q95H	0,57	0,06-5,55	0,626
Triglicérides X SNP Q95H	0,69	0,07-6,92	0,750
HOMA-IR X SNP Q95H	0,95	0,20-4,45	0,943
Fibrose X SNP Q95H	3,15	0,31-31,64	0,329
Atividade Inflamatória X SNP Q95H	0,41	0,08-1,98	0,264
Siderose X SNP Q95H	0,19	0,01-4,32	0,300
Hipertensão Arterial X SNP Q95H	0,87	0,20-3,73	0,852
Diabetes Mellitus X SNP Q95H	3,72	0,35-39,69	0,277
IMC X SNP Q95H	0,14	0,02-0,80	0,027

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; 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, apresentada na **Tabela 40**, observou-se que não houve associação significativa entre presença do alelo mutado (H) do SNP Q95H e variáveis de interesse que podem influenciar a esteatose em portadores crônicos do HCV. Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 40 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo Q95H com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV

Variável	OR	IC 95%	p
Sexo (feminino)	2,23	1,22-4,09	0,009
Genótipo 3 HCV	2,52	1,13-5,62	0,024
HOMA-IR (≥ 3)	1,60	0,85-3,01	0,145
Atividade Inflamatória (2-3)	5,08	2,65-9,75	<0,001
IMC (≥ 25)	1,33	0,69-2,55	0,397
SNP Q95H	7,89	1,44-43,12	0,017
SNP Q95H x IMC (≥ 25)	0,15	0,02-1,03	0,053

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; HCV: Vírus da hepatite C; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; IMC: Índice de massa corporal

4.7.4 Características avaliadas em relação ao polimorfismo Q244E

Para o polimorfismo Q244E foi avaliada a associação de diversos fatores relacionados à hepatite C crônica em somente um modelo genético, pois para esse polimorfismo não foi detectada a presença do homocigoto mutado em nenhum portador crônico do HCV. Desse modo não foi possível realizar a análise estatística com os outros modelos genéticos.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre os fatores analisados nos portadores crônicos do HCV e o polimorfismo Q244E do gene *MTTP* (Tabela 41).

Tabela 41 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o polimorfismo Q244H e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP Q244E		p
	QQ (n=209) n (%)	QE (n=27) n (%)	
Idade (anos)			0,725
<50	61 (29,2)	7 (25,9)	
≥50	148 (70,8)	20 (74,1)	
Sexo			0,251
Masculino	94 (45,0)	9 (33,3)	
Feminino	115 (55,0)	18 (66,7)	
Genótipo 3 HCV			0,794 ^a
Não	170 (81,3)	23 (85,2)	
Sim	39 (18,7)	4 (14,8)	
HOMA-IR			0,373
<3	137 (66,5)	15 (57,7)	
≥3	69 (33,5)	11 (42,3)	
ALT (U/L)			0,154
<41	92 (44,0)	8 (29,6)	
≥41	117 (56,0)	19 (70,4)	
AST (U/L)			0,378
<37	104 (49,8)	11 (40,7)	
≥37	105 (50,2)	16 (59,3)	
GGT (U/L)			0,233
<61	114 (54,5)	18 (66,7)	
≥61	95 (45,5)	9 (33,3)	
Ferro (µg/dL)			0,882
59-158	141 (67,8)	18 (69,2)	
>158	67 (32,2)	8 (30,8)	
Ferritina (ng/mL)			0,160
30-400	142 (68,3)	22 (81,5)	
>400	66 (31,7)	5 (18,5)	
Insulina (µU/mL)			0,721 ^a
<25	187 (90,8)	23 (88,5)	
≥25	19 (9,2)	3 (11,5)	
Glicose (mg/dL)			0,677
70-99	140 (67,0)	17 (63,0)	
>99	69 (33,0)	10 (37,0)	
Carga Viral (UI/ml)			0,696
<850.000	81 (40,5)	12 (44,4)	
≥850.000	119 (59,5)	15 (55,6)	
Fibrose			0,482
0-2	167 (79,9)	20 (74,1)	
3-4	42 (20,1)	7 (25,9)	
Siderose			0,684 ^a
Ausente	196 (93,8)	25 (92,6)	
Presente	13 (6,2)	2 (7,4)	

Continua

Tabela 41 - Distribuição das variáveis estudadas nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o polimorfismo Q244E e resultado dos testes de associação (Conclusão)

Variável	Resultados SNP Q244E		p
	QQ (n=209) n (%)	QE (n=27) n (%)	
Atividade Inflamatória			0,714
0-1	70 (33,5)	10 (37,0)	
2-3	139 (66,5)	17 (63,0)	
Hipertensão Arterial			0,622
Não	134 (64,1)	16 (59,3)	
Sim	75 (35,9)	11 (40,7)	
Diabetes Mellitus			0,576 ^a
Não	178 (85,2)	22 (81,5)	
Sim	31 (14,8)	5 (18,5)	
Disfunção na Tireoide			0,545 ^a
Não	182 (87,1)	25 (92,6)	
Sim	27 (12,9)	2 (7,4)	
IMC			0,174
<25	78 (38,2)	14 (51,9)	
≥25	126 (61,8)	13 (48,1)	

Teste qui-quadrado; ^aTeste exato de Fisher; Valor de p significativo: <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

4.7.4.1 Níveis de lipídeos e esteatose hepática em relação ao polimorfismo Q244E

Na **Tabela 42** estão apresentadas as análises de associação do polimorfismo Q244E com colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos e esteatose. Nenhuma correlação foi verificada entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos e a presença de esteatose hepática com o SNP Q244H nos portadores crônicos do HCV ($p>0,05$).

Tabela 42 - Distribuição dos lipídeos e da esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV (n=236) de acordo com o polimorfismo Q244E e resultado dos testes de associação

Variável	Resultados SNP Q244E		p
	QQ (n=209) n (%)	QE (n=27) n (%)	
Colesterol Total (mg/dL)			0,776
<200	160 (76,6)	20 (74,1)	
≥200	49 (23,4)	7 (25,9)	
HDL (mg/dL)			0,133
>60	63 (30,1)	12 (44,4)	
≤60	146 (69,9)	15 (55,6)	
LDL (mg/dL)			>0,999 ^a
<130	175 (83,7)	23 (85,2)	
≥130	34 (16,3)	4 (14,8)	
VLDL (mg/dL)			>0,999 ^a
<40	195 (93,3)	25 (92,6)	
≥40	14 (6,7)	2 (7,4)	
Triglicerídeos (mg/dL)			0,684 ^a
<200	196 (93,8)	25 (92,6)	
≥200	13 (6,2)	2 (7,4)	
Esteatose			0,486
Ausente	100 (47,8)	11 (40,7)	
Presente	109 (52,2)	16 (59,3)	

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

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

Na **Tabela 43** está demonstrada a associação dos diferentes graus de esteatose hepática com o polimorfismo Q244E. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo Q244E com os graus de esteatose nos portadores crônicos do HCV (p>0,05).

Tabela 43 - Descrição dos graus de esteatose hepática de acordo com o polimorfismo Q244E e resultado do teste de associação

SNP Q244E	Esteatose			p
	Grau 0 n (%)	Grau 1 n (%)	Grau 2 e 3 n (%)	
QQ	100 (47,8)	80 (38,3)	29 (13,9)	0,776
QE	11 (40,7)	12 (44,4)	4 (14,8)	

Teste da razão de verossimilhança; Valor de p significativo: <0,05

A análise bivariada dos fatores que poderiam influenciar a presença de esteatose, juntamente com o SNP Q244E, estão apresentados na **Tabela 44**. Nenhuma das variáveis incluídas na análise foi associada com a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV. Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 44 - Resultado das interações de primeira ordem de cada variável com o polimorfismo Q244E (QQ vs QE)

Variável	OR	IC 95%	p
Resultados SNP Q244E	1,33	0,59-3,01	0,487
Idade (≥50 anos) X SNP Q244E	3,39	0,46-24,87	0,229
Sexo (feminino) X SNP Q244E	3,52	0,58-21,56	0,174
Genótipo 3 HCV X SNP Q244E	-		
ALT X SNP Q244E	1,08	0,19-6,24	0,936
AST X SNP Q244E	1,10	0,20-5,92	0,912
GGT X SNP Q244E	0,41	0,07-2,28	0,309
Colesterol Total X SNP Q244E	7,88	0,73-85,12	0,089
HDL X SNP Q244E	0,63	0,12-3,40	0,595
LDL X SNP Q244E	3,39	0,27-42,14	0,342
VLDL X SNP Q244E	-		
Triglicérides X SNP Q244E	-		
HOMA-IR X SNP Q244E	0,81	0,15-4,44	0,810
Fibrose X SNP Q244E	0,74	0,10-5,44	0,763
Atividade Inflamatória X SNP Q244E	0,73	0,13-4,23	0,726
Siderose X SNP Q244E	-		
Hipertensão Arterial X SNP Q244E	0,90	0,17-4,83	0,905
Diabetes Mellitus X SNP Q244E	0,92	0,11-7,65	0,935
IMC X SNP Q244E	1,06	0,21-5,45	0,947

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; 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, apresentada na **Tabela 45**, observou-se que o polimorfismo Q244E do gene *MTTP* não influenciou a presença de esteatose hepática mesmo quando analisado em conjunto com outras variáveis. Dados publicados - Prata et al., 2022 (**Anexo D**).

Tabela 45 - Análise multivariada das interações de primeira ordem do polimorfismo Q244E com as características de interesse que influenciam a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV

Variável	OR	IC 95%	p
Sexo (feminino)	2,05	1,14-3,67	0,016
Genótipo 3 HCV	2,82	1,29-6,17	0,009
HOMA-IR (≥ 3)	1,73	0,94-3,18	0,079
Atividade Inflamatória (2-3)	4,52	2,44-8,39	<0,001
SNP Q244E	1,29	0,50-3,31	0,597

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

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

4.8 Análise de interação entre os polimorfismos no gene *MTTP* com a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV

Na **Tabela 46** está apresentado o resultado da análise de interação entre os polimorfismos estudados no gene *MTTP* (no modelo dominante) com a presença de esteatose hepática em portadores crônicos do HCV. Observou-se uma interação estatisticamente significativa entre os SNP -493G/T e -164T/C com a presença de esteatose ($p=0,048$), isto significa que, na presença dos alelos mutados para ambos os polimorfismos, a chance de apresentar esteatose aumenta em 12,83 vezes quando comparado com os indivíduos que não possuem essas características.

Tabela 46 - Resultado da análise de interação de primeira ordem entre os polimorfismos no gene *MTTP* de acordo com a esteatose nos portadores crônicos do HCV (n=236)

Variável	OR	IC 95%	p
SNP -400A/T X SNP -164T/C	2,29	0,50-10,49	0,286
SNP -400A/T X SNP H297Q	1,12	0,33-3,76	0,854
SNP -400A/T X SNP I128T	1,35	0,27-6,81	0,717
SNP -400A/T X SNP Q95H	-		
SNP -400A/T X SNP Q244E	0,44	0,08-2,33	0,335
SNP -400A/T X SNP -493G/T	2,73	0,71-10,44	0,143
SNP -164T/C X SNP H297Q	2,08	0,65-6,70	0,219
SNP -164T/C X SNP I128T	-		
SNP -164T/C X SNP Q95H	0,69	0,11-4,38	0,695
SNP -164T/C X SNP Q244E	0,89	0,17-4,57	0,888
SNP -164T/C X SNP -493G/T	12,83	1,02-161,15	0,048
SNP H297Q X SNP I128T	1,84	0,57-5,92	0,305
SNP H297Q X SNP Q95H	1,38	0,18-10,46	0,753
SNP H297Q X SNP Q244E	0,86	0,16-4,57	0,861
SNP H297Q X SNP -493G/T	1,82	0,57-5,84	0,317
SNP I128T X SNP Q95H	0,87	0,13-5,69	0,884
SNP I128T X SNP Q244E	0,63	0,12-3,30	0,588
SNP I128T X SNP -493G/T	5,82	0,44-77,71	0,183
SNP Q95H X SNP Q244E	1,12	0,09-13,91	0,933
SNP Q95H X SNP -493G/T	0,66	0,11-4,20	0,662
SNP Q244E X SNP -493G/T	1,15	0,23-5,89	0,866

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

4.9 Teste de associação dos polimorfismos na forma de haplótipos com a presença de esteatose hepática

A análise dos haplótipos foi realizada para avaliar os efeitos conjuntos da combinação dos sete SNPs do gene *MTTP* sobre a presença da esteatose hepática. No total 35 combinações haplotípicas foram identificadas e 12 apresentaram frequências superiores a 1%. Essas 12 combinações de alelos estão apresentadas na **Tabela 47**, sendo que nenhuma apresentou uma associação estatisticamente significativa com a esteatose em portadores crônicos do HCV ($p>0,05$).

Tabela 47 - Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos no gene *MTTP* de acordo com a esteatose nos portadores crônicos do HCV (n=236)

-164T/C	-400A/T	H297Q	-493G/T	I128T	Q95H	Q244E	Freq	OR	IC 95%	p
T	A	C	G	T	G	C	0,2997	1,00	-	-
T	A	G	G	T	G	C	0,1661	0,84	0,41-1,70	0,620
T	T	G	G	T	G	C	0,1358	1,05	0,49-2,23	0,900
C	T	G	T	C	G	C	0,1032	1,07	0,48-2,36	0,870
C	T	C	T	C	G	C	0,0869	1,26	0,48-3,30	0,630
C	T	G	T	C	C	C	0,0381	1,26	0,41-3,91	0,690
C	A	C	T	C	G	C	0,0231	0,30	0,05-1,66	0,170
T	A	C	G	T	G	G	0,021	0,73	0,12-4,38	0,730
T	A	C	T	T	G	C	0,0193	0,21	0,03-1,31	0,097
T	A	C	G	T	C	C	0,0127	1,67	0,02-172,14	0,830
T	A	G	G	T	G	G	0,0127	1,78	0,23-13,96	0,590
C	T	C	T	C	C	C	0,0123	1,47	0,14-15,82	0,750

Regressão logística múltipla ajustada por sexo, idade, AST, GGT, resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3), hipertensão arterial e genótipo 3 do HCV; Valor de p significativo: $<0,05$

Freq: Frequência; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança

4.10 Características associadas à resistência à insulina

A presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3,0) foi observada em 80 (34,5%) portadores crônicos do HCV. A fim de explorar esse dado, análises bivariadas (**Tabelas 48, 49 e 50**) e multivariadas foram realizadas para avaliar quais fatores estavam associados com a resistência à insulina (desfecho). Os fatores que tiveram um $p < 0,20$ na análise bivariada foram incluídos na análise multivariada (**Tabela 51**). Dentre as variáveis avaliadas na análise multivariada, níveis elevados de GGT ($p=0,006$) permaneceram associados com a presença de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV.

Tabela 48 - Fatores associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR ≥ 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)

Variável	Total n=232 n (%)	HOMA-IR		OR	IC 95%	p
		<3 n (%)	≥ 3 n (%)			
Idade (anos)						0,177
<50	68 (29,3)	49 (32,2)	19 (23,8)	1,00		
≥ 50	164 (70,7)	103 (67,8)	61 (76,3)	1,53	0,82-2,83	
Sexo						0,124
Masculino	100 (43,1)	60 (39,5)	40 (50,0)	1,00		
Feminino	132 (56,9)	92 (60,5)	40 (50,0)	0,65	0,38-1,13	
Genótipo 3 HCV						0,586
Não	190 (81,9)	126 (82,9)	64 (80,0)	1,00		
Sim	42 (18,1)	26 (17,1)	16 (20,0)	1,21	0,61-2,42	
Esteatose						0,028
Ausente	110 (47,4)	80 (52,6)	30 (37,5)	1,00		
Presente	122 (52,6)	72 (47,4)	50 (62,5)	1,85	1,07-3,22	
Fibrose						<0,001
0-2	186 (80,2)	132 (86,8)	54 (67,5)	1,00		
3-4	46 (19,8)	20 (13,2)	26 (32,5)	3,18	1,64-6,17	
Atividade Inflamatória						0,035
0-1	79 (34,1)	59 (38,8)	20 (25,0)	1,00		
2-3	153 (65,9)	93 (61,2)	60 (75,0)	1,90	1,04-3,48	
Hipertensão Arterial						0,066
Não	149 (64,2)	104 (68,4)	45 (56,3)	1,00		
Sim	83 (35,8)	48 (31,6)	35 (43,8)	1,69	0,96-2,95	
IMC						0,048
<25	90 (39,6)	66 (44,3)	24 (30,8)	1,00		
≥ 25	137 (60,4)	83 (55,7)	54 (69,2)	1,79	1,00-3,19	

Teste qui-quadrado; Análise bivariada

HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; HCV: Vírus da hepatite C; IMC: Índice de massa corporal

Tabela 49 - Exames laboratoriais associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)

Variável	Total n=232 n (%)	HOMA-IR		OR	IC 95%	p
		<3 n (%)	\geq 3 n (%)			
ALT (U/L)						<0,001
<41	98 (42,2)	78 (51,3)	20 (25,0)	1,00		
\geq 41	134 (57,8)	74 (48,7)	60 (75,0)	3,16	1,74-5,75	
AST (U/L)						<0,001
<37	113 (48,7)	89 (58,6)	24 (30,0)	1,00		
\geq 37	119 (51,3)	63 (41,4)	56 (70,0)	3,30	1,85-5,87	
GGT (U/L)						<0,001
8-61	130 (56,0)	102 (67,1)	28 (35,0)	1,00		
>61	102 (44,0)	50 (32,9)	52 (65,0)	3,79	2,14-6,70	
Colesterol Total (mg/dL)						0,087
<200	176 (75,9)	110 (72,4)	66 (82,5)	1,00		
\geq 200	56 (24,1)	42 (27,6)	14 (17,5)	0,56	0,28-1,09	
HDL (mg/dL)						0,653
>60	74 (31,9)	50 (32,9)	24 (30,0)	1,00		
\leq 60	158 (68,1)	102 (67,1)	56 (70,0)	1,14	0,64-2,06	
LDL (mg/dL)						0,126
<130	194 (83,6)	123 (80,9)	71 (88,8)	1,00		
\geq 130	38 (16,4)	29 (19,1)	9 (11,3)	0,54	0,24-1,20	
VLDL (mg/dL)						0,419
<40	216 (93,1)	143 (94,1)	73 (91,3)	1,00		
\geq 40	16 (6,9)	9 (5,9)	7 (8,8)	1,52	0,55-4,26	
Triglicerídeos (mg/dL)						0,305
<200	217 (93,5)	144 (94,7)	73 (91,3)	1,00		
\geq 200	15 (6,5)	8 (5,3)	7 (8,8)	1,73	0,60-4,95	

Teste qui-quadrado; Análise bivariada

HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; 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

Tabela 50 - Polimorfismos genéticos no gene *MTTP* no modelo dominante associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)

Polimorfismo	Total n=232 n (%)	HOMA-IR		OR	IC 95%	p
		<3 n (%)	\geq 3 n (%)			
SNP -164T/C						0,469
TT	112 (48,3)	76 (50,0)	36 (45,0)	1,00		
TC/CC	120 (51,7)	76 (50,0)	44 (55,0)	1,22	0,71-2,10	
SNP -400A/T						0,608
AA	79 (34,1)	50 (32,9)	29 (36,3)	1,00		
AT/TT	153 (65,9)	102 (67,1)	51 (63,8)	0,86	0,49-1,52	
SNP H297Q						0,906
HH	62 (26,7)	41 (27,0)	21 (26,3)	1,00		
HQ/QQ	170 (73,3)	111 (73,0)	59 (73,8)	1,04	0,56-1,92	
SNP -493G/T						0,599
GG	107 (46,1)	72 (47,4)	35 (43,8)	1,00		
GT/TT	125 (53,9)	80 (52,6)	45 (56,3)	1,16	0,67-2,00	
SNP I128T						0,463
II	115 (49,6)	78 (51,3)	37 (46,3)	1,00		
IT/TT	117 (50,4)	74 (48,7)	43 (53,8)	1,23	0,71-2,11	
SNP Q95H						0,280
QQ	194 (83,6)	130 (85,5)	64 (80,0)	1,00		
QH/HH	38 (16,4)	22 (14,5)	16 (20,0)	1,48	0,73-3,01	
SNP Q244E						0,373
QQ	206 (88,8)	137 (90,1)	69 (86,3)	1,00		
QE	26 (11,2)	15 (9,9)	11 (13,8)	1,46	0,64-3,34	

Teste qui-quadrado; Análise bivariada

HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

Tabela 51 - Análise multivariada dos fatores associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)

Variável	OR	IC 95%	p
Sexo (feminino)	0,79	0,40-1,58	0,505
Idade (\geq 50 anos)	1,20	0,57-2,51	0,637
IMC (\geq 25)	1,47	0,76-2,81	0,251
Colesterol total (alterado)	0,64	0,22-1,89	0,423
LDL (alterado)	0,77	0,22-2,67	0,677
Hipertensão arterial	1,28	0,65-2,53	0,481
ALT (alterado)	1,47	0,58-3,70	0,414
AST (alterado)	1,54	0,59-4,03	0,377
GGT (alterado)	2,52	1,31-4,88	0,006
Esteatose (1-3)	1,31	0,67-2,55	0,428
Fibrose (3-4)	1,93	0,88-4,24	0,100
Atividade Inflamatória (2-3)	0,91	0,43-1,93	0,799

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; IMC: Índice de massa corporal; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; GGT: Gama glutamil transferase

Na **Tabela 52** estão apresentados os resultados da associação dos sete SNPs do gene *MTTP* com a presença da resistência à insulina em uma regressão logística múltipla ajustada. Mesmo após o ajuste para algumas características, como níveis de GGT, que influenciaram estatisticamente a presença de resistência à insulina, os polimorfismos avaliados no gene *MTTP* não influenciaram estatisticamente a presença de resistência à insulina em portadores crônicos do HCV ($p>0,05$).

Tabela 52 - Regressão logística múltipla ajustada por sexo, idade, IMC e GGT dos polimorfismos no gene *MTTP* associados à presença de resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)

Variável	OR	IC 95%	p
SNP -164T/C (TC/CC)	1,33	0,17-10,39	0,783
SNP -400A/T (AT/TT)	0,61	0,26-1,42	0,248
SNP H297Q (HQ/QQ)	1,04	0,51-2,11	0,910
SNP -493G/T (GT/TT)	0,61	0,15-2,46	0,487
SNP I128T (IT/TT)	1,89	0,22-16,47	0,564
SNP Q95H (QH/HH)	1,15	0,51-2,58	0,740
SNP Q244E (QE)	1,93	0,77-4,84	0,164

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

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

4.11 Teste de associação dos polimorfismos na forma de haplótipos com a presença de resistência à insulina

Um teste de associação baseado em haplótipos foi realizado para avaliar os efeitos conjuntos da combinação dos sete SNPs do gene *MTTP* sobre a presença de resistência à insulina. No total foram identificadas 35 combinações haplotípicas e 10 apresentaram frequências superiores a 1%. Essas 10 combinações de alelos referentes aos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E, respectivamente, estão apresentadas na **Tabela 53**. Pela regressão logística múltipla, o haplótipo TACGTGG foi associado com a presença de resistência à insulina em portadores crônicos do HCV ($p=0,028$). Além disso, o haplótipo TTGGTGC pode ser um fator de proteção para a presença de resistência à insulina nessa população ($p=0,012$). A frequência encontrada dos alelos dos haplótipos associados com a resistência à insulina está apresentada nos **Gráficos 6 e 7**.

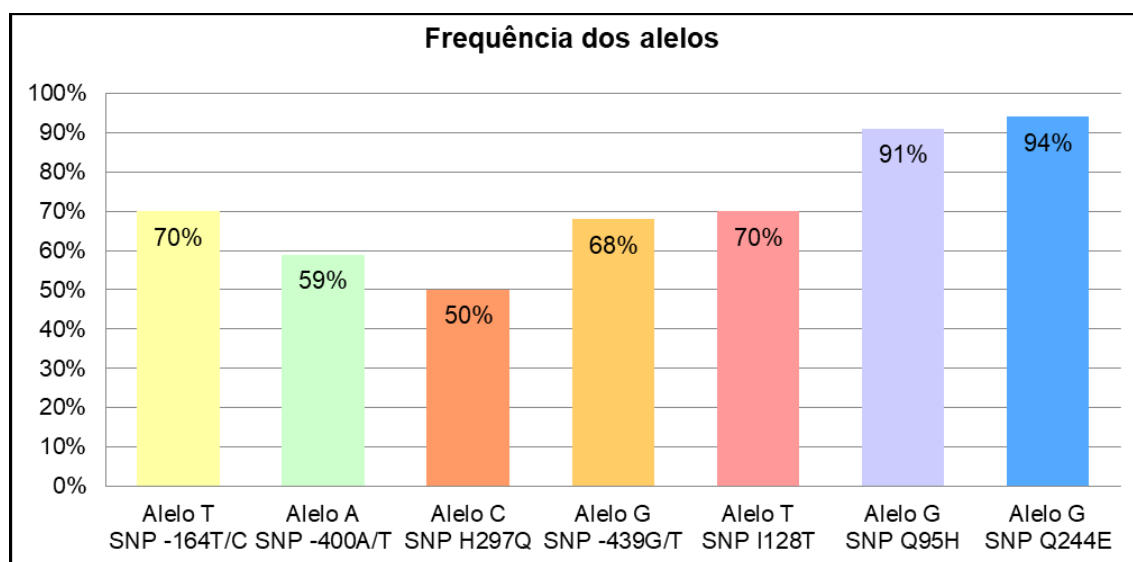
Tabela 53 - Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos no gene *MTTP* de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR \geq 3) nos portadores crônicos do HCV (n=232)

-164T/C	-400A/T	H297Q	-493G/T	I128T	Q95H	Q244E	Freq	OR	IC 95%	p
T	A	C	G	T	G	C	0,3045	1,00	-	-
T	A	G	G	T	G	C	0,1619	0,76	0,34-1,68	0,490
T	T	G	G	T	G	C	0,1386	0,31	0,12-0,77	0,012
C	T	G	T	C	G	C	0,1042	2,32	0,98-5,51	0,057
C	T	C	T	C	G	C	0,0853	0,84	0,29-2,40	0,740
C	T	G	T	C	C	C	0,0358	1,28	0,30-5,48	0,740
T	A	C	G	T	G	G	0,0246	6,90	1,25-38,06	0,028
C	A	C	T	C	G	C	0,0233	0,00	-	1,000
T	A	C	T	T	G	C	0,0195	0,17	0,01-2,13	0,170
T	A	C	G	T	C	C	0,0158	1,21	0,17-8,76	0,850

Regressão logística múltipla ajustada por sexo, idade, IMC, AST e GGT; Valor de p significativo: <0,05

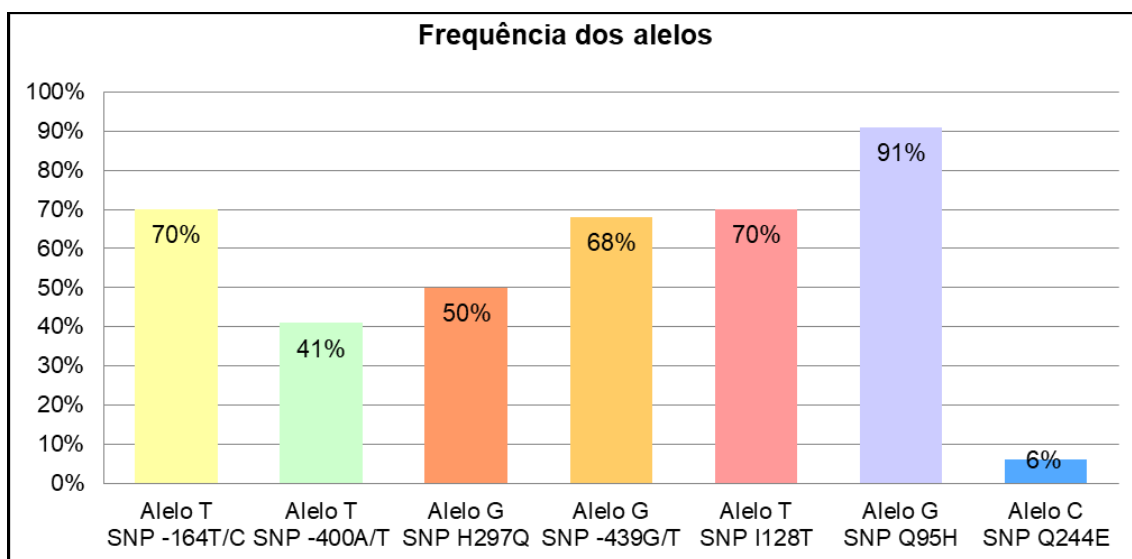
Freq: Frequência; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança

Gráfico 6 - Frequência dos alelos do haplótipo TACGTGG associado com a presença de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Excel 2003.

Gráfico 7 - Frequência dos alelos do haplótipo TTGGTGC associado com a proteção de resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV

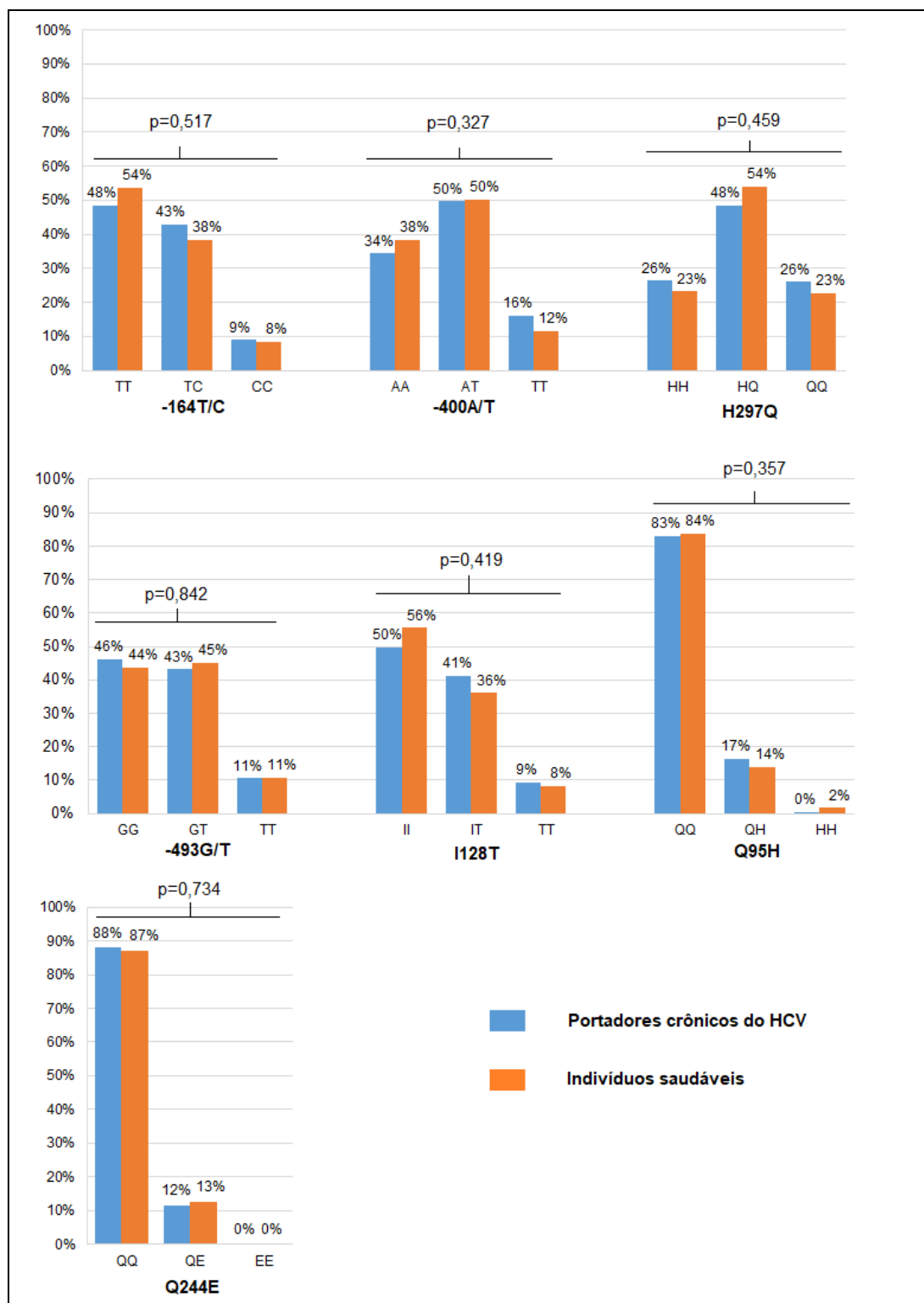


Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Excel 2003.

4.12 Resumo dos principais achados

As frequências genotípicas dos SNPs no gene *MTTP* não foram significativamente diferentes entre os portadores crônicos do HCV e os indivíduos saudáveis ($p > 0,05$) (**Gráfico 8**), estão todas em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$), e a frequência dos alelos mutados em todos os SNPs foi maior do que 5%.

Gráfico 8 - Características genéticas dos SNPs no gene *MTTP* nos portadores crônicos do HCV e nos indivíduos saudáveis

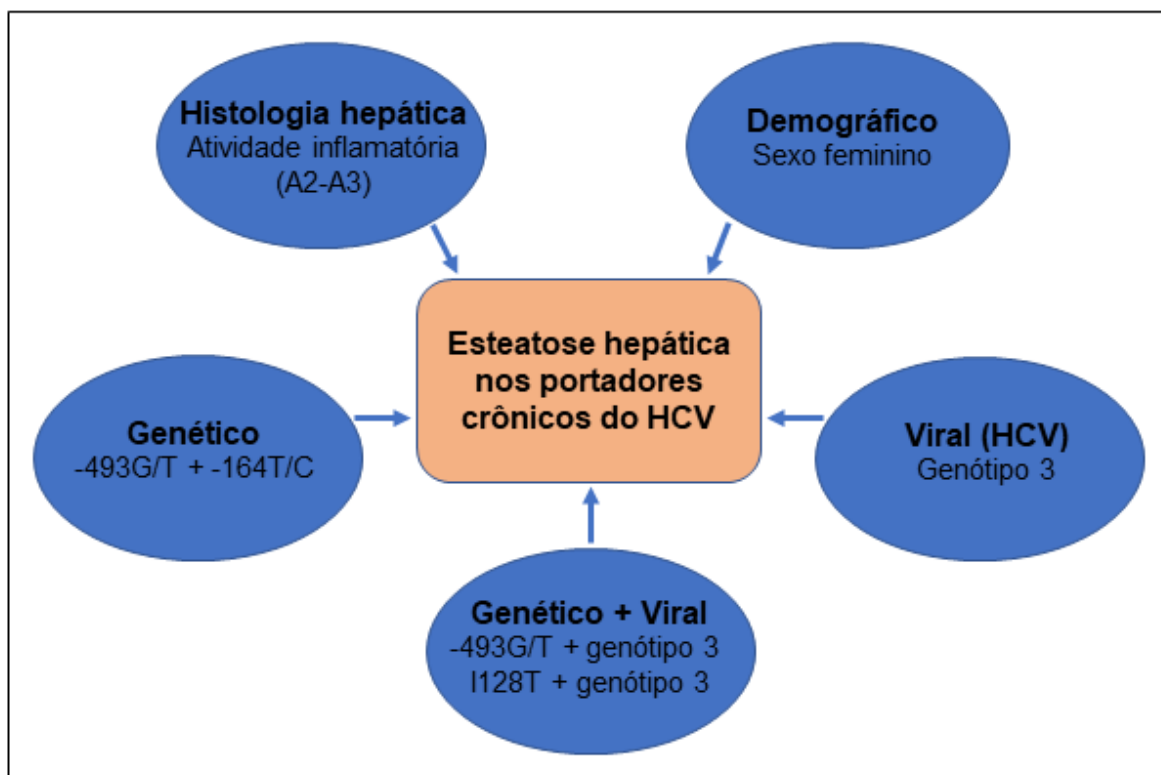


Valor de p significativo: <0,05

Fonte: elaborado pelo autor usando o programa Excel 2003.

Nos portadores crônicos do HCV, não foi observada uma correlação entre alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos com os SNPs no gene *MTTP* ($p>0,05$). Além disso, a presença de esteatose hepática foi associada com sexo feminino ($p=0,011$), genótipo 3 do HCV ($p=0,013$) e atividade inflamatória de moderada a alta intensidade (A2-A3) ($p<0,001$). Em relação aos SNPs no gene *MTTP*, a esteatose hepática foi associada com o SNP I128T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 ($p=0,012$), o SNP -493G/T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 ($p=0,005$) e com a interação entre os SNPs -493G/T e -164T/C ($p=0,048$) (**Figura 17**).

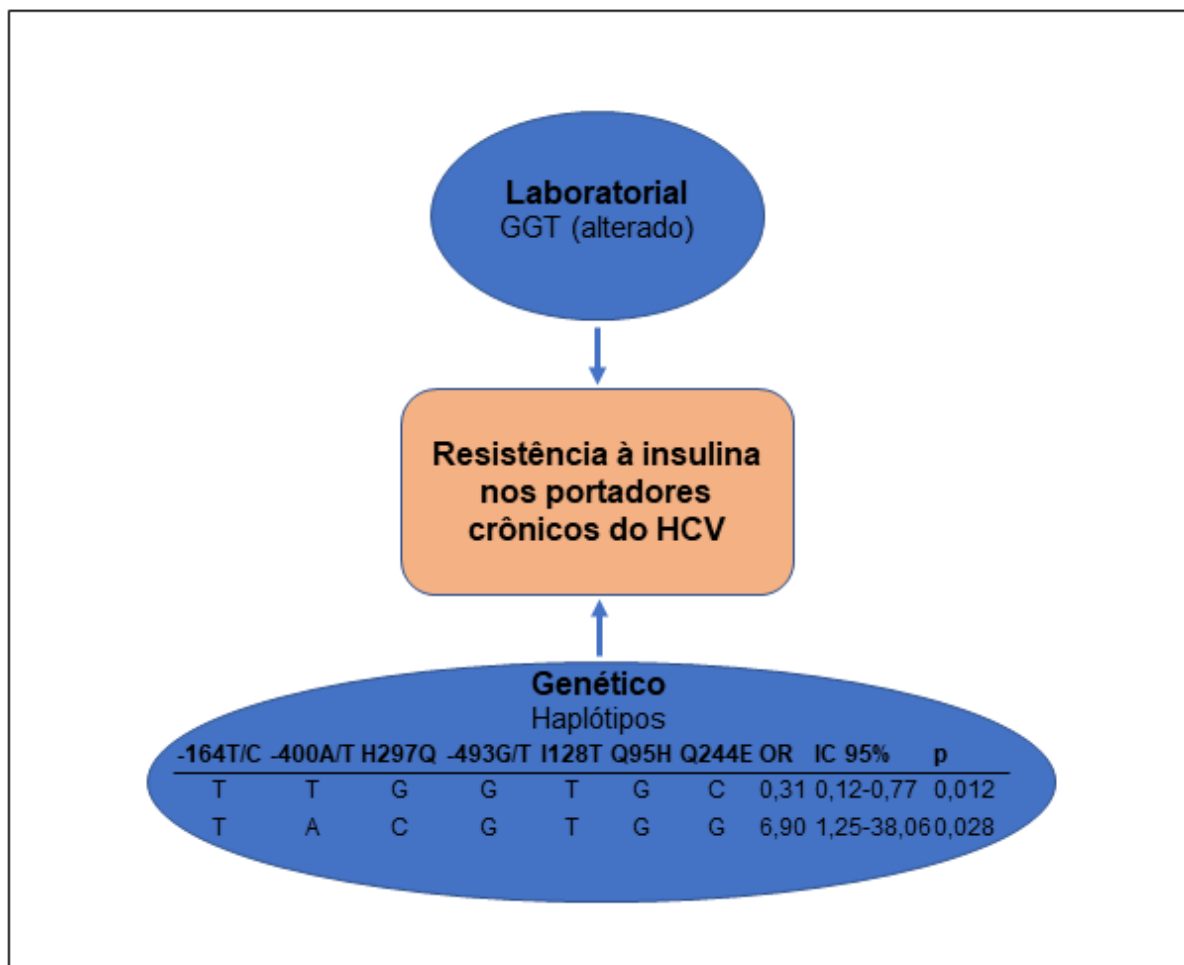
Figura 17 - Características associadas à esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV



Fonte: elaborado pelo autor usando o programa PowerPoint 2019.

Nos portadores crônicos do HCV, a presença de resistência à insulina foi associada com alterações nos níveis de GGT ($p=0,006$) e com duas combinações de haplótipos dos sete SNPs no gene *MTTP* ($p<0,05$) (**Figura 18**).

Figura 18 - Características associadas à resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV



Valor de p significativo: <0,05

OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; GGT: Gama glutamil transferase

Fonte: elaborado pelo autor usando o programa PowerPoint 2019.

5. DISCUSSÃO

A evolução na área das ciências biológicas e médicas proporcionaram novos estudos para identificação, caracterização e utilização de marcadores moleculares para estudos genéticos, incluindo metodologias para genotipagem de SNPs. De forma geral, estudos exploratórios sobre SNPs são capazes de gerar novos conhecimentos sobre determinada doença e podem colaborar para uma melhora na qualidade de vida dos pacientes caso seja comprovada a suscetibilidade. Portanto, a determinação de SNPs pode vir a contribuir para um melhor entendimento acerca do desenvolvimento de comorbidades e/ou doenças, como a esteatose hepática e a resistência à insulina, associadas à hepatite C. Além disso, a utilização de marcadores genéticos, como a genotipagem de SNPs, é considerada clinicamente útil porque pode potencialmente prever ou diagnosticar doenças, fornecer informações sobre a fisiopatologia da doença e pode ser usada para monitorar respostas farmacológicas ou prever resultados clínicos.

A hepatite C ainda é um problema relevante de saúde pública, pois, apesar dos avanços, há milhões de infectados pelo HCV no mundo (WHO, 2023). No Brasil, no período de 2000 a 2021, foram identificados 85.486 óbitos em consequência de infecções por hepatites virais dos tipos A, B, C e D, sendo que 76,1% desses óbitos foram em decorrência de complicações da hepatite C (Brasil, 2023). Muitos fatores metabólicos estão associados à infecção crônica pelo HCV, e esses fatores podem influenciar o curso da doença e impactar a progressão da doença hepática (Hajarizadeh; Grebely; Dore, 2013; Westbrook; Dusheiko, 2014; El-Kassas; Award, 2022; Mishra et al., 2022). Recentemente, em um estudo que incluiu 288.222 pacientes com infecção crônica pelo HCV, durante os anos de 2007 a 2020, foi observado que a prevalência de MAFLD aumentou significativamente de 19,0% para 43,3% no período do estudo. Os autores sugerem que a detecção precoce de disfunções metabólicas em pacientes com infecção crônica pelo HCV é recomendada para prevenir a progressão da MAFLD (Attia et al., 2022). Chaudhari et al. (2021) realizaram uma revisão sobre complicações metabólicas da infecção pelo HCV, e concluíram que tanto a esteatose hepática quanto a resistência à insulina podem influenciar a progressão da doença na infecção crônica pelo HCV (Chaudhari et al., 2021). No presente estudo foram avaliadas características clínicas,

laboratoriais e histológicas de 236 portadores crônicos do HCV. Além disso, levando em consideração que SNPs podem ser determinantes para categorizar algumas doenças, pois são variações genéticas comuns encontradas em nosso genoma (Kamatani; Nakamura, 2021). Foram realizadas padronizações para identificação de SNPs no gene *MTTP* na população com hepatite C crônica, e os dados foram correlacionados com a susceptibilidade para esteatose hepática e a resistência à insulina. Adicionalmente, foi realizada a genotipagem de sete SNPs no gene *MTTP* em uma população composta por 241 indivíduos saudáveis, a fim de verificar a frequência desses SNPs em uma população saudável brasileira cujo tema ainda é pouco explorado na literatura.

No presente estudo foi observado que as frequências alélicas e genótípicas dos SNPs no gene *MTTP* não foram significativamente diferentes entre os portadores crônicos do HCV e os indivíduos saudáveis. A frequência encontrada dos alelos mutados para os SNPs -164T/C, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* em ambos os grupos estudados foi praticamente a mesma descrita pelo projeto *Allele Frequency Aggregator* (ALFA), o qual analisou aproximadamente um milhão de indivíduos de 12 populações diferentes, incluindo europeus, hispânicos, africanos, asiáticos e outros. Entretanto, a frequência de alelos mutados para os SNPs -400A/T, H297Q, -493G/T em nossa população foi superior em ambos os grupos estudados quando comparadas com as frequências descritas na população global pelo projeto ALFA (**Tabela 54**). Essa diferença é atribuível à origem das populações, que apresentam distintos *backgrounds* genéticos e, além disso, o projeto ALFA foi composto por pouca população proveniente da América Latina, em especial do Brasil (Phan et al., 2020).

Tabela 54 - Descrição das frequências do alelo mutado de polimorfismos no gene *MTTP* identificados nas populações do presente estudo e no banco de dados de polimorfismo do NCBI

SNP	Alelo	Frequência do alelo mutado				
		NCBI Global	NCBI América Latina 1	NCBI América Latina 2	Grupo 1 Portadores crônicos do HCV	Grupo 2 Indivíduos saudáveis
-164T/C	T/C	0,26	0,26	0,17	0,30	0,27
-400A/T	A/T	0,37	0,46	0,26	0,41	0,37
H297Q	C/G (H/Q)	0,39	0,53	0,27	0,50	0,50
-493G/T	G/T	0,15	0,00*	0,00	0,32	0,33
I128T	T/C (I/T)	0,26	0,28	0,17	0,30	0,26
Q95H	G/C (Q/H)	0,05	0,04	0,02	0,09	0,09
Q244E	C/G (Q/E)	0,03	0,04	0,01	0,06	0,06

* Tamanho de amostra pequeno (n=68)

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; NCBI: *National Center for Biotechnology Information*; NCBI América Latina 1: Indivíduos latino-americanos com ancestralidade afro-caribenha; NCBI América Latina 2: Indivíduos latino-americanos com ancestralidade principalmente europeia e nativa americana.

A frequência do alelo mutado do SNP -164T/C no gene *MTTP* observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,27, em dois estudos realizados na Alemanha a frequência do alelo mutado encontrada para esse SNP foi de 0,23-0,26 (Rubin et al., 2008; di Giuseppe et al., 2013) e na Suécia a frequência observada foi de 0,22 (Aminoff et al., 2010). A frequência do alelo mutado do SNP -400A/T observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,37, na população da Alemanha foi de 0,28 (Rubin et al., 2008) e na população da Suécia foi de 0,29 (Ledmyr et al., 2002). A frequência do alelo mutado do SNP H297Q observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,50, na população da Suécia foi de 0,23 (Ledmyr et al., 2002), de Taiwan foi de 0,40 (Hsiao et al., 2015) e do Reino Unido foi de 0,32 (Talmud et al., 2000). A frequência do alelo mutado do SNP -493G/T observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,34, na população da China foi de 0,14 (Peng et al., 2014), da Alemanha foi de 0,23 (Rubin et al., 2008), da Suécia foi de 0,24 (Ledmyr et al., 2002), do Egito foi de 0,34 (Gouda et al., 2017) e do Reino Unido foi de 0,25 (Talmud et al., 2000). A frequência do alelo mutado do SNP I128T

observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,26, na população da Suécia foi de 0,24 (Ledmyr et al., 2002), do Irã foi de 0,33 (Hashemi et al., 2011), e da Alemanha foi de 0,26 (di Giuseppe et al., 2013). A frequência do alelo mutado do SNP Q95H observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,09, na população da Suécia foi de 0,04 (Ledmyr et al., 2002), do Irã foi de 0,03 (Hashemi et al., 2011) e do Reino Unido foi de 0,05 (Talmud et al., 2000). A frequência do alelo mutado do SNP Q244E observada na população brasileira estudada (indivíduos saudáveis) foi de 0,06 e na população da Suécia também foi de 0,06 (Ledmyr et al., 2002).

A avaliação de variações genéticas de um agrupamento específico de indivíduos é influenciada pela ancestralidade ou mesmo a raça. Isto quer dizer que indivíduos que possuem ancestrais geográficos antigos compartilhados, em geral, possuem variação genética similar (Rosenberg et al., 2002; Jorde; Wooding, 2004; Peng et al., 2022). Apesar da diversidade nos estudos mencionados acima, em geral, as frequências dos alelos mutados foram relativamente semelhantes. Além disso, foi possível perceber que nos dados encontrados no presente estudo (nos grupos de indivíduos saudáveis e de portadores crônicos do HCV) e nos descritos na literatura científica, a frequência do genótipo homozigoto mutado para todos os polimorfismos avaliados no gene *MTTP* foi a mais baixa em todas as populações, como esperado.

As distribuições dos genótipos dos SNPs estudados no gene *MTTP* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambas populações, portadores crônicos do HCV e indivíduos saudáveis. Isto significa que nenhuma das variantes se desviou significativamente do esperado. Vale ressaltar que os achados sobre as frequências dos alelos e genótipos dos SNPs no presente estudo são uma situação de mundo real, mas estão de acordo com o que é esperado em uma população de acasalamento aleatório, com amostragem aleatória aproximada, entre outros fatores, e que provavelmente não existiram erros de genotipagem (Ryckman; Williams, 2008; Waples, 2015). Ledmyr et al. (2002) avaliaram os SNPs -493G/T, -400A/T, -164T/C, H297Q, Q95H, I128T e Q244E no gene *MTTP* em uma população saudável e esses SNPs também estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Ledmyr et al., 2002). Algumas pesquisas observaram que o SNP -493G/T apresenta um alto desequilíbrio de ligação com outras variantes genéticas no gene *MTTP*, como os SNPs -164T/C e

I128T. Essa associação condiz com o que foi identificado no presente estudo, além disso, observou-se que os SNPs -164T/C e I128T apresentaram um alto desequilíbrio de ligação na população de pacientes com hepatite C (Aminoff et al., 2010; Ledmyr et al., 2002; Peng et al., 2014). Em um estudo realizado com uma população mexicana, o qual avaliou seis diferentes polimorfismos no gene *MTTP*, os resultados sobre alto desequilíbrio de ligação corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, os SNPs -493G/T, -164T/C e I128T estavam em desequilíbrio de ligação (Luévano et al., 2009). Atualmente, o aumento de estudos de SNPs levou a um maior reconhecimento da importância do desequilíbrio de ligação entre os marcadores intimamente ligados e o potencial de sua aplicação para ajudar a entender a base genética de características complexas na medicina humana, em estudos da área da saúde e em outras áreas, como a agricultura (Sved; Hill, 2018).

Como mencionado anteriormente, a proteína MTTP apresenta um papel indispensável na manutenção do equilíbrio do colesterol corporal por meio de vias de absorção, síntese, transferência e secreção. A estrutura da proteína MTTP possui a capacidade de se ligar e transferir uma ampla variedade de moléculas lipídicas, sugerindo facilidade de ligação e/ou presença de múltiplos sítios de ligação a lipídeos (Biterova et al., 2019). Variantes genéticas no gene precursor dessa proteína, o gene *MTTP*, podem influenciar os níveis de lipoproteínas e lipídeos plasmáticos (Karpe et al., 1998; Wolff et al., 2011; Miyaaki; Nakao, 2017; Gonzalez-Becerra et al., 2018). Um trabalho que incluiu 523 participantes mexicanos observou que os indivíduos que carregavam o alelo mutado (T) para o SNP -493G/T no gene *MTTP* apresentaram níveis elevados de colesterol total e de LDL, e elevada taxa de prevalência de hipercolesterolemia (Gonzalez-Becerra et al., 2018). Já em um estudo com 2831 indivíduos saudáveis da Europa foi observado que indivíduos que carregavam ambos os alelos mutado (QQ) para o SNP H297Q e apresentavam níveis elevados de triglicerídeos ou em combinação com o alelo mutado (T) do SNP -493G/T, em geral, tiveram elevação nos níveis de ApoB. Os autores concluíram que as variações genéticas no gene *MTTP* podem influenciar os níveis de produção e secreção de ApoB e, desse modo, favorecendo, indivíduos saudáveis, a apresentar um aumento nos níveis de lipídeos (Talmud et al., 2000).

No presente estudo, foram avaliados sete diferentes polimorfismos no gene *MTTP* (-164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E) e os mesmos não foram associados com alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos) em portadores crônicos do HCV. Na hepatite C, sabe-se que a via de biossíntese do colesterol é necessária para a replicação do vírus e, desse modo, o HCV remodela as vias de lipoproteínas, em especial os níveis de VLDL, para uma replicação mais eficiente. Muitas pesquisas documentaram efeitos da infecção pelo HCV nos níveis séricos dos lipídeos e encontraram uma associação com níveis baixos de colesterol total, LDL e ApoB (Patel et al., 2010; Bassendine et al., 2013; Popescu et al., 2014). Recentemente, Sheridan et al. (2022) demonstraram que existem alterações no metabolismo lipídico relacionadas ao genótipo do HCV. Foi observado que a infecção pelo genótipo 3 do HCV (quando comparada com a infecção pelo genótipo 1) é caracterizada por níveis baixos de colesterol LDL e associada ao aumento da esteatose hepática (Sheridan et al., 2022). Assim, mesmo que os polimorfismos no gene *MTTP* possam influenciar os níveis de lipídeos plasmáticos em indivíduos saudáveis ou em indivíduos com síndrome metabólica, mais estudos são necessários para confirmar se SNPs nesse gene podem alterar os níveis de colesterol total e frações na hepatite C crônica.

Uma recente revisão concluiu que, após a erradicação do HCV utilizando esquemas de DAAs, o impacto clínico na reversão das manifestações metabólicas provenientes da hepatite C ainda é controverso (Elgretli et al., 2023). Fatores do hospedeiro e fatores virais estão envolvidos no desenvolvimento e severidade da esteatose associada ao HCV (Björnsson; Angulo, 2007). Estudos relatam que sua ocorrência varia de 40% a 80% nos portadores crônicos do HCV (Negro, 2010; Leslie et al., 2022). No presente estudo foi observada uma prevalência de 53% de esteatose hepática entre os brasileiros portadores crônicos do HCV. Essa prevalência foi semelhante à prevalência de 60% observada entre 231 indivíduos alemães com infecção pelo HCV, ambas avaliadas por biópsia hepática (Schelbert et al., 2022). Um estudo conduzido na Tailândia, que incluiu 101 portadores crônicos do HCV com ou sem infecção por HIV, avaliou a esteatose hepática por PDFF (*proton density fat fraction*) e encontrou uma prevalência de 21,7% antes do tratamento com DAAs. Entretanto, todos os pacientes eram infectados pelo genótipo 1 do HCV. Ao final da terapia com DAA foi observada uma prevalência de 34,9% de

esteatose, e os fatores associados a esse aumento da prevalência foram presença de diabetes, aumento do IMC e presença de polimorfismo no gene *PNPLA3* (Chuaypen et al., 2022). Por outro lado, estudo conduzido na Romênia que incluiu 102 pacientes infectados pelo HCV, todos infectados pelo genótipo 1 do HCV, encontrou uma prevalência de 88% de esteatose hepática antes do tratamento com DAAs. Nesse trabalho a esteatose foi avaliada pelo *Fibromax (SteatoTest)*, que é um teste realizado a partir de uma amostra de sangue (Gavril et al., 2021).

Diferenças na prevalência da esteatose hepática em portadores crônicos do HCV podem sofrer variação entre diferentes populações e tempo de infecção. Porém, atualmente também se faz importante levar em consideração a acurácia da metodologia utilizada para a avaliação da presença e graus da esteatose. Embora o uso da biópsia hepática avalie corretamente a esteatose, esse é um procedimento invasivo e sujeito a complicações, e atualmente existem diversas técnicas não invasivas para o manejo de doenças crônicas do fígado. Diversas técnicas de imagem, incluindo métodos baseados em ressonância magnética e ultrassons, foram desenvolvidos para diagnosticar a esteatose hepática. Em uma revisão com meta-análise, Karlas et al. (2017) mostraram que o parâmetro de atenuação controlada - *controlled attenuation parameter (CAP)*, avaliado por elastografia transitória, fornece uma medida não invasiva padronizada de esteatose para pacientes com doença hepática crônica. Porém, ressaltaram que algumas variáveis, como etiologia, diabetes e IMC, devem ser levadas em consideração ao interpretar o CAP (Karlas et al., 2017). Outra meta-análise identificou que os pontos de corte do CAP variaram de acordo com a causa e podem efetivamente reconhecer esteatose significativa em pacientes com hepatite viral, mas não pode graduar adequadamente a esteatose em pacientes com DHGNA. Em resumo, a utilização do CAP para classificação não invasiva da esteatose hepática como propriedades diagnósticas dependem substancialmente da etiologia (Petroff et al., 2021). Recentemente, Zeng et al. (2023) descreveram que, dentre diversas técnicas existentes hoje, a espectroscopia por ressonância magnética - *magnetic resonance spectroscopy (MRS)* e *magnetic resonance imaging-proton density fat fraction (MRI-PDFF)* são as modalidades de imagem mais precisas para medição quantificada de esteatose hepática, mas possuem baixa acessibilidade e alto custo (Zeng et al., 2023). Entretanto Ichikawa e Goshima (2023) concluíram que a técnica que melhor avalia a

esteatose hepática é MRI-PDFF, enquanto que a elastografia por ressonância magnética (RM) é a técnica que melhor avalia a fibrose hepática (Ichikawa; Goshima, 2023).

No presente estudo foi observado, na análise multivariada, associação significativa da presença de esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV com sexo feminino, infecção pelo genótipo 3 do HCV e atividade inflamatória de moderada a alta intensidade. Alguns estudos observaram uma maior prevalência de esteatose entre as mulheres quanto comparadas com aos homens. Codes et al. (2007) avaliaram a gravidade da esteatose em mulheres com hepatite C crônica que estão passando pelo climatério. Foi observada uma maior frequência e um grau mais elevado de esteatose hepática em mulheres depois da menopausa proveniente de um aumento da prevalência da síndrome metabólica (Codes et al., 2007). Consistente com nossos resultados foi encontrada uma associação significativa, na análise multivariada, da esteatose hepática com o sexo feminino. Acredita-se que mulheres na pós-menopausa tenham taxas aumentadas de fibrose e esteatose em comparação com mulheres em idade reprodutiva porque perderam os efeitos protetores do estrogênio (Fierbințeanu-Braticevici et al., 2010; Khan et al., 2015; Afsari et al., 2017).

Uma característica intrigante da infecção pelo HCV é sua estreita conexão com o metabolismo hepático. Proteínas virais do HCV, especialmente no genótipo 3, demonstraram influenciar o metabolismo da glicose e dos lipídeos (Leslie et al., 2022). A associação significativa entre a presença de esteatose hepática com infecção pelo genótipo 3 do HCV, assim como a observada no presente estudo, já foi descrita por diversos autores (Rubbia-Brandt et al., 2004; Lonardo et al., 2006; Esfeh; Ansari-Gilani, 2016; Zarębska-Michaluk, 2021). Por muitos anos, a infecção pelo genótipo 3 do HCV foi considerada menos patogênica em comparação com outros genótipos do HCV devido a sua maior taxa de RVS em relação ao regime de tratamento baseado em IFN. No entanto, a observação de maior prevalência da esteatose em indivíduos com a infecção pelo genótipo 3 do HCV e de uma esteatose mais severa, além de uma progressão mais rápida para fibrose hepática, mudou essa convicção (Zarębska-Michaluk, 2021).

A atividade inflamatória de moderada a alta intensidade também foi um fator associado com a esteatose entre os portadores crônicos do HCV incluídos no

presente estudo. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados em uma meta-análise que incluiu dados de 3.068 pacientes com hepatite C crônica confirmada por avaliação histológica, arrolados em 10 centros clínicos na Itália, Suíça, França, Austrália e Estados Unidos. Nesse estudo, a presença de esteatose foi associada na análise multivariada com a infecção pelo genótipo 3, fibrose, diabetes, inflamação hepática, abuso contínuo de álcool, aumento do IMC e idade avançada (Leandro et al., 2006). O estudo conduzido por Asselah et al. (2003) também encontrou algumas associações na análise multivariada. O aumento do IMC, alto grau de atividade inflamatória e a infecção pelo genótipo 3 foram fatores independentes e significativamente associados à presença de esteatose em uma população de 290 portadores crônicos do HCV (Asselah et al., 2003).

Recentemente, alguns SNPs foram associados a alterações na fibrose e esteatose hepática mesmo após a terapia com DAA na infecção pelo HCV, indicando que polimorfismos genéticos podem ter valor prognóstico para a avaliação da evolução do paciente após a RVS (Gavril et al., 2021; Matsumoto et al., 2022). No presente estudo a esteatose hepática foi associada ao genótipo GT/TT do SNP -493G/T no gene *MTTP* em pacientes com genótipo 3 do HCV. O risco de esteatose foi 11,51 vezes maior em portadores crônicos do HCV com essas características associadas. Os portadores crônicos do HCV que apresentaram o genótipo IT/TT do SNP I128T e a infecção pelo genótipo 3 do HCV também apresentaram um risco maior de apresentar esteatose, de 8,51 vezes. Diversos estudos exploraram a relação entre a DHGNA e os SNPs -493G/T e I128T do gene *MTTP* (Oliveira et al., 2010; Hashemi et al., 2011; Peng et al., 2014). No entanto, o efeito desses polimorfismos na DHGNA permanece incerto devido aos resultados inconsistentes dos diferentes estudos. Uma recente meta-análise avaliou esses SNPs sob cinco diferentes modelos genéticos e conseguiu demonstrar que o SNP -493G/T está associado a um aumento do risco de desenvolver EHNA (Tan et al., 2020). Akgöllü e Akkız, em 2019, avaliaram a associação do polimorfismo -493G/T no gene *MTTP* com a esteatose hepática em uma população com hepatite C e não foi observada associação entre o SNP e a esteatose em uma população turca com infecção pelo genótipo 1 do HCV (Akgöllü; Akkız, 2019). Entretanto, outro trabalho, que avaliou pacientes italianos virgens de tratamento para hepatite C, identificou uma

associação do alelo mutado do SNP -493G/T com a presença de esteatose nos pacientes com a infecção pelo genótipo 3 do HCV (Zampino et al., 2008).

No presente estudo não foi encontrada associação significativa, após a análise multivariada, dos SNPs Q95H e Q244E com a esteatose hepática nos portadores crônicos do HCV mesmo quando foram analisados em conjunto com outras características. Na literatura atual ainda há poucos estudos sobre esses SNPs na hepatite C. Hashemi et al. (2011) não observaram associação entre o SNP Q95H no gene *MTTP* e a DHGNA em um estudo caso-controle conduzido com 83 pacientes diagnosticados com DHGNA e 93 indivíduos saudáveis (Hashemi et al., 2011). Portanto, mais estudos com maiores populações se fazem necessários para confirmar esse achado.

Um resultado importante e relevante do presente estudo foi a identificação de uma associação estatisticamente significativa entre os SNPs -493G/T e -164T/C no gene *MTTP* com a presença de esteatose, isto significa que na presença dos alelos mutados para ambos os polimorfismos a chance de apresentar esteatose associada a hepatite C aumenta em 12,83 vezes quando comparado com os indivíduos que não possuem essas características. Interessantemente, nossa análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs -493G/T e -164T/C revelou que apresentaram um alto desequilíbrio de ligação ($D':0,93$), confirmando que de fato há uma associação não aleatória entre seus alelos nessa população de portadores crônicos do HCV. Aparentemente, a esteatose hepática pode ser também resultante de um conjunto de variações genéticas. Diversos SNPs em diferentes genes já foram associados com o desenvolvimento da esteatose em portadores crônicos do HCV (Cai et al., 2011; Coppola et al., 2015a; Eslam et al., 2016; Fan et al., 2016; Kralj et al., 2016). Além disso, estudos que avaliam os efeitos combinados entre polimorfismos na infecção pelo HCV têm se mostrado relevantes (Gao et al., 2017; Huang et al., 2017; Toro et al., 2021; Tao et al., 2022), uma vez que os polimorfismos podem contribuir para o desenvolvimento de doenças e comorbidades e alguns podem não ter funções independentes. Tao et al. (2022), por exemplo, descreveram que polimorfismos nos genes *Transporter associated with antigen processing (TAP)* e *HLA-I* podem apresentar um efeito combinado na suscetibilidade à hepatite C crônica (Tao et al., 2022). Polimorfismos nos genes interleucina-10 (*IL-10* - rs1800872) e interleucina-4 (*IL-4* - rs2243250) foram descritos como tendo um

efeito sinérgico na lesão inflamatória hepática em pacientes com infecção por HCV (Gao et al., 2017). Os genótipos dos SNPs no gene *IFNL3/4* (rs12979860 CC e rs809917 TT), na análise de interação com o SNP no gene *PNPLA3* (rs738409), forneceram proteção contra a esteatose hepática em pacientes asiáticos com hepatite C crônica (Huang et al., 2017). Em síntese, sabe-se que variações genéticas, quando associadas, podem influenciar fenótipos hepáticos clinicamente importantes, incluindo surgimento de inflamação, progressão da fibrose e o desenvolvimento de HCC (Heim; Bochud; George, 2016).

Polimorfismos genéticos no gene *MTTP* parecem influenciar os níveis de insulina. Em um estudo com homens saudáveis da Suécia, foi observada uma associação do alelo mutado dos SNPs -493G/T e Q95H no gene *MTTP* com o aumento nos níveis de insulina (Ledmyr et al., 2002). Em outro estudo, a presença do alelo mutado (T) do polimorfismo -493G/T foi associada com níveis elevados de insulina, colesterol total, triglicerídeos, VLDL e também com aumento do índice HOMA-IR em homens diagnosticados com síndrome metabólica (Zák et al., 2008). Semelhante ao presente estudo foi observada uma associação de altos níveis de insulina com os SNPs I128T e Q95H no gene *MTTP* em portadores crônicos do HCV. Faltam dados sobre a associação de polimorfismos no gene *MTTP* com os níveis de insulina em pacientes com hepatite C crônica.

O HCV pode induzir o desenvolvimento de resistência à insulina por diversos mecanismos. Além disso, a resistência à insulina está associada a um risco aumentado de desenvolver pré-diabetes e, possivelmente, diabetes mellitus tipo 2 (Alzahrani, 2022), doença cardiovascular e renal em pacientes com hepatite C crônica (Fabrizi; Donato; Messa, 2017). No presente estudo foi observada uma prevalência de 34% de resistência à insulina entre os portadores crônicos do HCV, e essa prevalência foi menor do que a descrita por Villar et al. (2017). Esse estudo encontrou uma prevalência de 62% de resistência à insulina em 214 participantes com hepatite C crônica atendidos em um hospital no Rio de Janeiro (Villar et al., 2017), porém, nesse estudo foi utilizado um valor de corte menor para resistência à insulina (HOMA-IR > 2) quando comparado ao presente estudo (HOMA-IR ≥ 3). Entretanto, Shawky et al. (2020) encontraram uma prevalência de resistência à insulina muito semelhante ao presente estudo, 35% (considerando HOMA-IR > 2,7), e descreveram que pacientes com hepatite C crônica e cirrose apresentavam níveis

mais elevados de resistência à insulina do que pacientes sem cirrose (Shawky et al., 2020). Em outro estudo, foram incluídos 80 pacientes cronicamente infectados com o genótipo 4 do HCV e a prevalência de resistência à insulina descrita foi de 45% (El Sagheer et al., 2018).

Na análise multivariada conduzida para investigar características associadas com a resistência à insulina nos portadores crônicos do HCV do presente estudo, níveis elevados de GGT foi o único parâmetro associado, aumentando o risco de resistência à insulina em 2,52 vezes. A GGT é uma enzima hepática que está presente nas membranas da maioria dos tipos celulares, mais comumente nos hepatócitos. Sucintamente, a GGT desempenha um papel relevante na manutenção das defesas antioxidantes celulares e está relacionada a diversas doenças crônicas. A elevação dos níveis de GGT está associada ao aumento de doenças vasculares, síndrome metabólica, diabetes, câncer, doença renal crônica, fraturas, demência e mortalidade (Kunutsor, 2016). Recentemente, níveis séricos elevados de GGT foram associados a um risco aumentado de síndrome metabólica avaliado entre 5.960 adultos coreanos (Kwak; Seo; Lee, 2023) e, também, foram associados a um risco aumentado de diabetes (Li et al., 2022). Bacinschi et al. (2022) avaliaram pacientes com hepatite C crônica e observaram níveis elevados de GGT em pacientes com alteração no metabolismo da glicose (Bacinschi et al., 2022). Se a GGT é de fato um fator de risco para fatores metabólicos e resistência à insulina ainda precisa ser investigado e esclarecido.

Para explorar as altas taxas de prevalência de resistência à insulina em portadores crônicos do HCV, como a encontrada no presente estudo e as descritas acima, alguns estudos avaliaram a relação de polimorfismos genéticos com resistência à insulina. Esta associação foi encontrada em alguns estudos, embora em outros não (Rembeck et al., 2012; Degasperi et al., 2014; Jiménez-Sousa et al., 2014). Rembeck et al. (2012) analisaram o impacto do SNP I148M no gene *PNPLA3* em diversas características metabólicas em 382 pacientes que nunca receberam terapia para hepatite C crônica e encontraram uma associação desse polimorfismo com resistência à insulina nesses indivíduos (Rembeck et al., 2012). No presente estudo os sete diferentes polimorfismos avaliados no gene *MTTP* parecem isoladamente não influenciar a presença de resistência à insulina em portadores crônicos do HCV; até onde sabemos, este é o primeiro estudo que apresenta esses

resultados. Mais estudos em amostras maiores ou investigando outros genes são necessários para elucidar a participação de variantes genéticas do hospedeiro no desenvolvimento da resistência à insulina associada à hepatite C.

No teste de associação baseado em haplótipos foi observado que, em portadores crônicos do HCV, certas combinações dos alelos dos polimorfismos no gene *MTTP* desempenharam um papel significativo na resistência à insulina. Alguns estudos realizaram análise de haplótipos de diferentes variantes genéticas e demonstraram que polimorfismos do hospedeiro nos genes *VDR*, *KIR2DL3* e *IFNL4* estão envolvidos na infecção pelo HCV (Coppola et al., 2015b; Roy et al., 2019). El-Khair et al. (2018) avaliaram a relação de dois polimorfismos no gene *XRCC1* com o desenvolvimento de resistência à insulina em 140 pacientes egípcios com hepatite C crônica. A presença de uma determinada combinação de alelos dos SNPs foi associada à suscetibilidade à resistência à insulina nessa população (El-Khair et al., 2018). Em resumo, alguns SNPs no gene *MTTP* podem influenciar os níveis de insulina nos portadores crônicos dos HCV. Embora os polimorfismos -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E isoladamente não tenham influenciado a presença de resistência à insulina na população do estudo, a combinação de seus alelos pode desempenhar um papel relevante na resistência à insulina. Com base nesses dados, consideramos a análise de haplótipos como uma análise interessante para estudos de associação.

O presente estudo apresenta certas limitações. Os portadores crônicos do HCV são provenientes de um único centro, e devido a isso, os dados encontrados não necessariamente representam todos os pacientes. A coleta de sangue para a execução dos exames de laboratório não foi efetuada no mesmo dia do procedimento da biópsia hepática, apesar de um dos critérios de inclusão desse estudo ter sido apresentar uma biópsia recente. Ainda, foi incluído um pequeno número de pacientes infectados pelo genótipo 3 do HCV, porém, trata-se de um espelho da situação atual brasileira na qual o genótipo 1 do HCV é responsável por grande parte das infecções. Embora não tenhamos sido capazes de avaliar as terapias com DAA nesses pacientes devido às limitações do desenho do estudo, como o período em que foi realizada a coleta das amostras biológicas e dos dados (anterior à introdução de DAAs), uma prevalência considerável de esteatose hepática e de resistência à insulina foram encontradas nesses pacientes brasileiros

com hepatite C crônica. Isso destaca a necessidade de monitorar portadores crônicos do HCV com a expectativa de reverter características metabólicas após a terapia com DAA, conforme observado por Casas-Deza et al. (2023). Em uma relevante e atual revisão, os autores concluíram que, na era dos DAAs, altas taxas de RVS significam que as consequências diretas das funções intracelulares do HCV não são uma preocupação primária (Leslie et al., 2022). No entanto, a ingestão de álcool, a obesidade e as complicações metabólicas relacionadas à hepatite C crônica precisam ser consideradas, pois apresentam impacto no manejo clínico de pacientes após uma RVS e provavelmente desempenham um papel significativo na progressão da doença hepática crônica para desenvolvimento de HCC (Leslie et al., 2022; Luna-Cuadros et al., 2022).

Os resultados obtidos fornecem evidências sobre a influência de diferentes polimorfismos genéticos na infecção crônica pelo HCV, e possivelmente, o presente estudo é pioneiro ao incluir pacientes brasileiros sob essa perspectiva. Alguns dos polimorfismos estudados no gene *MTTP* apresentam potencial de serem marcadores genéticos para detecção precoce da esteatose hepática (-493G/T, I128T e -164T/C) nos portadores crônicos do HCV. Além disso, com esse trabalho também foi possível contribuir para o conhecimento acerca das frequências dos SNPs -164T/C, -400A/T, -493G/T, I128T, Q95H, Q244E e H297Q no gene *MTTP* em indivíduos saudáveis do Brasil. Portanto, o presente estudo apresenta informações biológicas relevantes que podem auxiliar as futuras pesquisas científicas sobre biomarcadores na esteatose hepática. Não obstante, após a conclusão o Projeto Genoma Humano em 2003, intensificaram-se os estudos relacionados à aplicação de dados do genoma à medicina e isso acelerou a descoberta de polimorfismos/mutações relacionados a doenças e aprimorou o conhecimento das bases moleculares de diversas patologias (Findlay, 2021). Desde então, novos caminhos estão se abrindo para a aplicação da genômica na prática clínica, e estudar os efeitos das variantes genéticas é fundamental para entender a suscetibilidade individual à doença (Wong et al., 2021). Por outro lado, vale ressaltar que a pesquisa de precisão ou medicina personalizada exige esforços e possui enormes desafios principalmente em saúde pública, como, por exemplo, o desenvolvimento de políticas que implementam iniciativas de precisão em saúde

pública em vários níveis, a necessidade de melhorar a integração de dados e a incorporação de iniciativas que abordem equidade em saúde (Roberts et al., 2021).

6. CONCLUSÕES

Foi possível realizar a genotipagem dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* nos 236 portadores crônicos do HCV (Grupo 1) e nos 241 indivíduos saudáveis (Grupo 2).

Grupo 1 - Portadores crônicos do HCV

- A presença de esteatose hepática foi observada em 53% dos portadores crônicos do HCV e foi associada ao sexo feminino, ao genótipo 3 do HCV e à atividade inflamatória de moderada a alta intensidade (A2-A3).
- As frequências genóticas dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* entre os portadores crônicos do HCV estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a frequência dos alelos mutados em todos os SNPs foi maior do que 5% e a análise do desequilíbrio de ligação revelou que três pares de SNPs apresentaram um alto desequilíbrio de ligação ($D' > 0.93$).
- Os SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* não foram associados com alteração nos níveis de lipídeos plasmáticos (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos).
- O SNP -493G/T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV foi associado com a presença de esteatose hepática.
- O SNP I128T em conjunto com a infecção pelo genótipo 3 do HCV foi associado com a presença de esteatose hepática.
- A interação entre os SNPs -493G/T e -164T/C foi associada com a presença de esteatose hepática.
- A presença de resistência à insulina foi observada em 34,5% dos portadores crônicos do HCV e foi associada com alterações nos níveis de GGT.
- A presença de combinações de haplótipos TACGTGG e TTGGTGC dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP*, respectivamente, foram associadas com resistência à insulina na hepatite C crônica.

Grupo 2 - Indivíduos saudáveis

- As frequências genóticas dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* entre os indivíduos saudáveis estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a frequência dos alelos mutados em todos os SNPs foi maior do que 5% e a análise do desequilíbrio de ligação revelou alto desequilíbrio de ligação somente entre os SNPs -493G/T e I128T.
- As frequências alélicas e genóticas dos SNPs -164T/C, -400A/T, H297Q, -493G/T, I128T, Q95H e Q244E no gene *MTTP* não foram significativamente diferentes entre os portadores crônicos do HCV e os indivíduos saudáveis.

REFERÊNCIAS

Adinolfi LE, Restivo L, Marrone A. The predictive value of steatosis in hepatitis C virus infection. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Mar;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 May;17(6):1-12.

Afsari A, Lee E, Shokrani B, Boortalary T, Sherif ZA, Nouraie M, Laiyemo AO, Alkhaloufi K, Brim H, Ashktorab H. Clinical and Pathological Risk Factors Associated with Liver Fibrosis and Steatosis in African-Americans with Chronic Hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2017 Aug;62(8):2159-65.

Akgöllü E, Akkız H. Association between hepatic steatosis and MTP gene -493G/T polymorphism in the patients with HCV genotype 1 infection. *Infect Genet Evol*. 2019 Jun;70:101-6.

Alzahrani N. Hepatitis C virus, insulin resistance, and diabetes: A review. *Microbiol Immunol*. 2022 Oct;66(10):453-9.

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, Gåfväls 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 Jan;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 Aug;20(29):9633-52.

Asselah T, Boyer N, Guimont MC, Cazals-Hatem D, Tubach F, Nahon K, Daïkha H, Vidaud D, Martinot M, Vidaud M, Degott C, Valla D, Marcellin P. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2003 Nov;52(11):1638-43.

Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut*. 2006 Jan;55(1):123-30.

Attia D, Abdel Alem S, El-Akel W, Abdel-Razek W, Eslam M, Fouad Y, Waked I. Prevalence and clinical characteristics of patients with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease with hepatitis C virus infection-a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022 Dec;56(11-12):1581-90.

Bacinschi X, Mercan-Stanciu A, Toma L, Zgura A, Bacalbasa N, Ifrim CP, Diaconu C, Iliescu L, Toma RV. Glycemic Control in Patients Undergoing Treatment With Paritaprevir/Ombitasvir/Ritonavir and Dasabuvir for Chronic Hepatitis C Infection. *In Vivo*. 2022 May-Jun;36(3):1438-43.

Baker PR 2nd, Friedman JE. Mitochondrial role in the neonatal predisposition to developing nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2018 Aug;128(9):3692-3703.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan;21(2):263-5.

Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RD. Lipids and HCV. *Semin Immunopathol*. 2013 Jan;35(1):87-100.

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

Biterova EI, Isupov MN, Keegan RM, Lebedev AA, Sohail AA, Liaqat I, Alanen HI, Ruddock LW. The crystal structure of human microsomal triglyceride transfer protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Aug;116(35):17251-60.

Björnsson E, Angulo P. Hepatitis C and steatosis. *Arch Med Res*. 2007 Aug;38(6):621-7.

Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, Subramanian MG, McHutchison JG, Mo H, Svarovskaia E, Shafran SD. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 2018 Oct;218(11):1722-9.

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; 2023.

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; 2019.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul;234(2):177-86.

Cacoub P, Saadoun D. Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV Infection. *N Engl J Med*. 2021 Mar;384(11):1038-52.

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, MTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *J Hepatol*. 2011 Sep;55(3):529-35.

Casas-Deza D, Espina S, Martínez-Sapiña A, Del Moral-Bergos R, Garcia-Sobreviela MP, Lopez-Yus M, Calmarza P, Bernal-Monterde V, Arbones-Mainar JM. Triglyceride-rich lipoproteins and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C receiving direct-acting antivirals. *Atherosclerosis*. 2023 Jun;375:59-66.

Chaudhari R, Fouda S, Sainu A, Pappachan JM. Metabolic complications of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2021 Apr;27(13):1267-82.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr;244(4902):359-62.

Chuaypen N, Siripongsakun S, Hiranrat P, Tanpowpong N, Avihingsanon A, Tangkijvanich P. Improvement of liver fibrosis, but not steatosis, after HCV eradication as assessment by MR-based imaging: Role of metabolic derangement and host genetic variants. *PLoS One*. 2022 Jun;17(e0269641):1-14.

Codes L, Asselah T, Cazals-Hatem D, Tubach F, Vidaud D, Paran  R, Bedossa P, Valla D, Marcellin P. Liver fibrosis in women with chronic hepatitis C: evidence for the negative role of the menopause and steatosis and the potential benefit of hormone replacement therapy. *Gut*. 2007 Mar;56(3):390-5.

Coppola N, Pisaturo M, Sagnelli C, Onorato L, Sagnelli E. Role of genetic polymorphisms in hepatitis C virus chronic infection. *World J Clin Cases*. 2015a Sep;3(9):807-22.

Coppola N, Rosa Z, Cirillo G, Stanzione M, Macera M, Boemio A, Grandone A, Pisaturo M, Marrone A, Adinolfi LE, Sagnelli E, Miraglia del Giudice E. TM6SF2 E167K variant is associated with severe steatosis in chronic hepatitis C, regardless of PNPLA3 polymorphism. *Liver Int*. 2015b Aug;35(8):1959-63.

Dai D, Wen F, Zhou S, Su Z, Liu G, Wang M, Zhou J, He F. Association of MTTP gene variants with pediatric NAFLD: A candidate-gene-based analysis of single nucleotide variations in obese children. *PLoS One*. 2017 Sep;12(9):1-14.

Degasperi E, Valenti L, Aghemo A, De Francesco R, Rumi M, Soffredini R, Donnici L, Cheroni C, Fargion S, Zanoni V, Orsi E, Colombo M. Interleukin 28B genotype and insulin resistance in chronic hepatitis C patients. *Antivir Ther*. 2014 Feb;19(8):747-53.

di Giuseppe R, Pechlivanis S, Fisher E, Arregui M, Weikert B, Kn ppel 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 Jan;14(19):1-9.

Dietz C, Maasoumy B. Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Virus Infection-From Drug Discovery to Successful Implementation in Clinical Practice. *Viruses*. 2022 Jun;14(6):1-12.

Diniz MFHS, Beleigoli AMR, Schmidt MI, Duncan BB, Ribeiro ALP, Vidigal PG, Bense or IM, Lotufo PA, Santos IS, Griep RH, Barreto SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and metabolic syndrome at baseline of a multicentric Brazilian cohort: ELSA-Brasil study. *Cad Saude Publica*. 2020 Sep;36(8):1-7.

Dore GJ, Trooskin S. People with Hepatitis C Who Inject Drugs - Underserved, Not Undeserving. *N Engl J Med*. 2020 Aug;383(7):608-11.

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 Feb;158(4):235-45.

El Sagheer G, Soliman E, Ahmad A, Hamdy L. Study of changes in lipid profile and insulin resistance in Egyptian patients with chronic hepatitis C genotype 4 in the era of DAAs. *Libyan J Med*. 2018 Dec;13(1435124):1-7.

Elgretli W, Chen T, Kronfli N, Sebastiani G. Hepatitis C Virus-Lipid Interplay: Pathogenesis and Clinical Impact. *Biomedicines*. 2023 Jan;11(271):1-17.

El-Kassas M, Awad A. Metabolic aspects of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*. 2022 Jun;28(22):2429-36.

El-Khair SMA, Arafa M, Besheer T, El-Eraky AM, Elsamanoudy AZ. The Association of XRCC1 Gene Polymorphisms and Chronic Hepatitis C Induced Insulin Resistance in Egyptian Patients. *Cells*. 2018 Oct;7(185):1-13.

Esfeh JM, Ansari-Gilani K. Steatosis and hepatitis C. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2016 Feb;4(1):24-9

Eslam M, Mangia A, Berg T, Chan HL, Irving WL, Dore GJ, Abate ML, Bugianesi E, Adams LA, Najim MA, Miele L, Weltman M, Mollison L, Cheng W, Riordan S, Fischer J, Romero-Gomez M, Spengler U, Nattermann J, Rahme A, Sheridan D, Booth DR, McLeod D, Powell E, Liddle C, Douglas MW, van der Poorten D, George J; International Liver Disease Genetics Consortium. Diverse impacts of the rs58542926 E167K variant in TM6SF2 on viral and metabolic liver disease phenotypes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):34-46.

Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1999-2014.

Fabrizi F, Donato FM, Messa P. Hepatitis C and its metabolic complications in kidney disease. *Ann Hepatol*. 2017 Nov-Dec;16(6):851-61.

Fan JH, Xiang MQ, Li QL, Shi HT, Guo JJ. PNPLA3 rs738409 Polymorphism Associated with Hepatic Steatosis and Advanced Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C Virus: A Meta-Analysis. *Gut Liver*. 2016 May;10(3):456-63.

Fareed M, Afzal M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. *Egypt J Med Hum Genet*. 2013 Apr;14(2):123-34.

Ferrufino RQ, Bierrenbach AL, Rodrigues C, Figueiredo GM, Gleison D, Yapura S, de Matos MLM, Vasconcelos R, Sol Witkin S, Mendes-Correa MC. The Changing Epidemiology of Hepatitis C Virus Acquisition Among HIV-Infected Individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2023 Jan;39(1):44-9.

Fierbințeanu-Braticevici C, Mohora M, Tribus L, Petrișor A, Crețoiu SM, Crețoiu D, Usvat R, Ioniță L. Hepatocyte steatosis in patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *Rom J Morphol Embryol*. 2010 May;51(2):235-42.

Findlay GM. Linking genome variants to disease: scalable approaches to test the functional impact of human mutations. *Hum Mol Genet*. 2021 Oct;30(R2):R187-R197.

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 May;45(5):1097-107.

Gao QJ, Xie JX, Wang LM, Zhou Q, Zhang SY. Interaction effects among IFN- γ +874, IL-2-330, IL-10-1082, IL-10-592 and IL-4-589 polymorphisms on the clinical progression of subjects infected with hepatitis B virus and/or hepatitis C virus: a retrospective nested case-control study. *BMJ Open*. 2017 Aug;7(e013279):1-7.

Gavril OI, Arhire LI, Gavrilescu O, Dranga M, Barboi O, Gavril RS, Popescu R, Cijevschi Prelipcean C, Trifan AV, Mihai C. Role of PNPLA3 in the Assessment and Monitoring of Hepatic Steatosis and Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C Infection Who Achieved a Sustained Virologic Response. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Oct;57(1153):1-12.

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 Apr;46(4):1467-76.

Gouda W, Ashour E, Shaker Y, Ezzat W. MTP genetic variants associated with non-alcoholic fatty liver in metabolic syndrome patients. *Genes Dis*. 2017 Oct;4(4):222-8.

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 Nov;61(S1):S45-S57.

Guntipalli P, Pakala R, Kumari Gara S, Ahmed F, Bhatnagar A, Endaya Coronel MK, Razzack AA, Solimando AG, Thompson A, Andrews K, Enebong Nya G, Ahmad S, Ranaldo R, Cozzolongo R, Shahini E. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastroenterol Belg*. 2021 Oct-Dec;84(4):637-56.

Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Sep;10(9):553-62.

Hanus JS, Ceretta LB, Simões PW, Tuon L. Incidence of hepatitis C in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Nov-Dec;48(6):665-73.

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 Aug;30(8):569-75.

Heim MH, Bochud PY, George J. Host - hepatitis C viral interactions: The role of genetics. *J Hepatol.* 2016 Oct;65(S1):S22-S32.

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. MTP-297H polymorphism reduced serum cholesterol but increased risk of non-alcoholic fatty liver disease-a cross-sectional study. *BMC Med Genet.* 2015 Oct;16:2-10.

Huang CM, Chang KC, Hung CH, Chiu KW, Lu SN, Wang JH, Chen CH, Kee KM, Kuo YH, Tsai MC, Tseng PL, Lin MT, Wu CK, Hu TH, Cho CL, Yen YH. Impact of PNPLA3 and IFNL3 polymorphisms on hepatic steatosis in Asian patients with chronic hepatitis C. *PLoS One.* 2017 Aug;12(e0182204):1-13.

Ichikawa S, Goshima S. Clinical Significance of Liver MR Imaging. *Magn Reson Med Sci.* 2023 Apr;22(2):157-75.

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 Mar;21(3):189-97.

Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and 'race'. *Nat Genet.* 2004 Nov;36(S11):S28-S33.

Juanola O, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 May;18(5227):1-24.

Kamatani Y, Nakamura Y. Genetic variations in medical research in the past, at present and in the future. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2021 Jun;97(6):324-35.

Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Lédighen V, Kumar M, Lupsor-Platon M, Han KH, Cardoso AC, Ferraioli G, Chan WK, Wong VW, Myers RP, Chayama K, Friedrich-Rust M, Beaugrand M, Shen F, Hiriart JB, Sarin SK, Badea R, Jung KS, Marcellin P, Filice C, Mahadeva S, Wong GL, Crotty P, Masaki K, Bojunga J, Bedossa P, Keim V, Wiegand J. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol.* 2017 May;66(5):1022-30.

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 May;18(5):756-61.

Kelley RK, Greten TF. Hepatocellular Carcinoma - Origins and Outcomes. *N Engl J Med.* 2021 Jul;385(3):280-2.

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 Jan-Mar;27(1):105-7.

Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol.* 2013 Mar;19(1):17-25.

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 Jun;41(6):1313-21.

Klevstig M, Arif M, Mannila M, Svedlund S, Mardani I, Ståhlman M, Andersson L, Lindbom M, Miljanovic A, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Jeppsson A, Gan LM, Levin M, Mardinoglu A, Ehrenborg E, Borén J. Cardiac expression of the microsomal triglyceride transport protein protects the heart function during ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2019 Dec;137:1-8.

Kralj D, Jukić LV, Stojsavljević S, Duvnjak M, Smolić M, Čurčić IB. Hepatitis C Virus, Insulin Resistance, and Steatosis. *J Clin Transl Hepatol.* 2016 Mar;4(1):66-75.

Kunutsor SK. Gamma-glutamyltransferase-friend or foe within? *Liver Int.* 2016 Dec;36(12):1723-34.

Kwak J, Seo IH, Lee YJ. Serum γ -glutamyltransferase level and incidence risk of metabolic syndrome in community dwelling adults: longitudinal findings over 12 years. *Diabetol Metab Syndr.* 2023 Feb;15(29):1-9.

Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol.* 2003 Apr;5(2):43-60.

Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today.* 1999 Dec;5(12):538-43.

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 Jan;1688(1):61-7.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Feb;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 May;130(6):1636-42.

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 Jan;43(1):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 Jul;20(28):9270-80.

Leslie J, Geh D, Elsharkawy AM, Mann DA, Vacca M. Metabolic dysfunction and cancer in HCV: Shared pathways and mutual interactions. *J Hepatol*. 2022 Jul;77(1):219-36.

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

Li J, Arafa A, Kashima R, Teramoto M, Nakao YM, Honda-Kohmo K, Sakai Y, Watanabe E, Dohi T, Kokubo Y. Liver enzymes, alcohol consumption and the risk of diabetes: the Suita study. *Acta Diabetol*. 2022 Dec;59(12):1531-7.

Liou YJ, Tsai SJ, Wang YC, Bai YM, Hong CJ. Genetic variants of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) are associated with metabolic syndrome in schizophrenic patients treated with atypical antipsychotics. *J Clin Psychopharmacol*. 2013 Jun;33(3):313-8.

Lloyd AR, Franco RA. Sexual Transmission of Viral Hepatitis. *Infect Dis Clin North Am*. 2023 Jun;37(2):335-49.

Lonardo A, Lombardini S, Scaglioni F, Carulli L, Ricchi M, Ganazzi D, Adinolfi LE, Ruggiero G, Carulli N, Loria P. Hepatic steatosis and insulin resistance: does etiology make a difference? *J Hepatol*. 2006 Jan;44(1):190-6.

Lonardo A, Singal AK, Osna N, Kharbanda KK. Effect of cofactors on NAFLD/NASH and MAFLD. A paradigm illustrating the pathomechanics of organ dysfunction. *Metab Target Organ Damage*. 2022;2(3):1-16.

Luévano KE, González JR, Perea FJ, Magaña MT. Linkage disequilibrium between four MTP gene polymorphisms in a Mexican population. *Ann Hum Biol.* 2009 Mar-Apr;36(2):211-9.

Luna-Cuadros MA, Chen HW, Hanif H, Ali MJ, Khan MM, Lau DT. Risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus cure. *World J Gastroenterol.* 2022 Jan;28(1):96-107.

Maeda M, Murayama N, Ishii H, Uryu N, Ota M, Tsuji K, Inoko H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens.* 1989 Nov;34(5):290-8.

Magri MC, Manchiero C, Dantas BP, Nunes AKS, Prata TVG, Domingos DEA, Nascimento GS, Alvarez MSM, Bernardo WM, Tengan FM. Hepatitis C Among People Who Inject Drugs (PWID) in Latin America and the Caribbean: A Meta-Analysis of Prevalence Over Three Decades. *J Stud Alcohol Drugs.* 2023 Jan;84(1):118-27.

Magri MC, Prata TV, 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 Mar;17(235):1-10.

Manne V, Ryan J, Wong J, Vengayil G, Basit SA, Gish RG. Hepatitis C vaccination: Where we are and where we need to be. *Pathogens.* 2021 Dec;10(12):1-9.

Matsumoto K, Miyaaki H, Fukushima M, Sasaki R, Haraguchi M, Miuma S, Nakao K. The impact of single-nucleotide polymorphisms on liver stiffness and controlled attenuation parameter in patients treated with direct-acting antiviral drugs for hepatitis C infection. *Biomed Rep.* 2022 Feb;16(9):1-8.

Mirandola S, Bowman D, Hussain MM, 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 Feb;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 Apr;29(4):557-65.

Mishra PR, Bharti A, Arora R, Mir IA, Punia VPS. Increased Insulin Resistance in Hepatitis-C Infection-Association with Altered Hepatic Function Testing. *Pathophysiology.* 2022 Jun;29(3):326-32.

Miyaaki H, Nakao K. Significance of genetic polymorphisms in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin J Gastroenterol.* 2017 Jun;10(3):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 Feb;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 Oct;20(5):519-38.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51:263-73.

Negro F, Forton D, Craxì A, Sulkowski MS, Feld JJ, Manns MP. Extrahepatic morbidity and mortality of chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2015 Nov;149(6):1345-60.

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

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson *Genética Médica*. 6ª ed. Barueri: Guanabara Koogan, 2002. p.83-5.

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 Sep;58(9):1306-11.

Oliveira BR, Magalhães O, Furlanetto TW, Bertoluci MC. Increased insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with type 2 diabetes and chronic hepatitis C. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Feb;79(2):e11-2.

Oliveira CP, Stefano JT, Cavaleiro AM, Zanella Fortes MA, Vieira SM, Rodrigues Lima VM, Santos TE, Santos VN, de Azevedo Salgado AL, Parise ER, Ferreira Alves VA, Carrilho FJ, Corrêa-Giannella ML. Association of polymorphisms of glutamate-cystein ligase and microsomal triglyceride transfer protein genes in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Feb;25(2):357-61.

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 Mar;67(3):219-23.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2766-70.

Pan SL, Luo XQ, Lu ZP, Lu SH, Luo H, Liu CW, Hu CY, Yang M, Du LL, Song Z, Pang GF, Wu HY, Huang JB, Peng JH, Yin RX. Microsomal triglyceride transfer protein gene -493G/T polymorphism and its association with serum lipid levels in

Bama Zhuang long-living families in China. *Lipids Health Dis.* 2012 Dec;11(177):1-14.

Patel JH, Cobbold JF, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Hepatitis C and hepatic steatosis. *QJM.* 2010 May;103(5):293-303.

Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology.* 2016 Jul;151(1):70-86.

Peng G, Pakstis AJ, Gandotra N, Cowan TM, Zhao H, Kidd KK, Scharfe C. Metabolic diversity in human populations and correlation with genetic and ancestral geographic distances. *Mol Genet Metab.* 2022 Nov;137(3):292-300.

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

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 Feb;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 Feb;16(2):185-94.

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

Petroff D, Blank V, Newsome PN, Shalimar, Voican CS, Thiele M, de Lédinghen V, Baumeler S, Chan WK, Perlemuter G, Cardoso AC, Aggarwal S, Sasso M, Eddowes PJ, Allison M, Tsochatzis E, Anstee QM, Sheridan D, Cobbold JF, Naveau S, Lupsor-Platon M, Mueller S, Krag A, Irlés-Depe M, Semela D, Wong GL, Wong VW, Villela-Nogueira CA, Garg H, Chazouillères O, Wiegand J, Karlas T. Assessment of hepatic steatosis by controlled attenuation parameter using the M and XL probes: an individual patient data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2021 Mar;6(3):185-198.

Phan L, Jin Y, Zhang H, Qiang W, Shekhtman E, Shao D, Revoe D, Villamarin R, Ivanchenko E, Kimura M, Wang Y, Hao L, Sharopova N, Bihan M, Sturcke A, Lee M, Popova N, Wu W, Bastiani C, Ward M, Holmes JB, Lyoshin V, Kaur K, Feolo M, Kattman BL. "ALFA: Allele Frequency Aggregator." National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Atualizado em março de 2020, [acesso em 01 de agosto de 2023]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/>.

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

Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar;2(3):161-76.

Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)*. 2014 Dec;3(4):892-921.

Prata TVG, Manchiero C, Dantas BP, Nunes AKDS, Tengan FM, Magri MC. Effect of MTTP -493G/T, I128T, Q95H and Q244E polymorphisms on hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022 Aug;77(100094):1-8.

Prata TVG, Silva DSRD, Manchiero C, Dantas BP, Mazza CC, Nunes AKDS, Abdala E, Figueiredo GM, Tengan FM, Magri MC. MTTP polymorphisms and hepatic steatosis in individuals chronically infected with hepatitis C virus. *Arch Virol*. 2019a Oct;164(10):2559-63.

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: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2019b.

Razavi H. Global Epidemiology of Viral Hepatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2020 Jun;49(2):179-89.

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 Jul;72:94-108.

Rembeck K, Maglio C, Lagging M, Christensen PB, Färkkilä M, Langeland N, Buhl MR, Pedersen C, Mørch K, Norkrans G, Hellstrand K, Lindh M, Pirazzi C, Burza MA, Romeo S, Westin J; NORDynamIC group. PNPLA 3 I148M genetic variant associates with insulin resistance and baseline viral load in HCV genotype 2 but not in genotype 3 infection. *BMC Med Genet*. 2012 Sep;13(82):1-7.

Richardson MM, Powell EE, Barrie HD, Clouston AD, Purdie DM, Jonsson JR. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet*. 2005 Jul;42(7):1-6.

Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, Romero D, Abdelmalek MF, Anstee QM, Arab JP, Arrese M, Bataller R, Beuers U, Boursier J, Bugianesi E, Byrne C, Castro Narro GE, Chowdhury A, Cortez-Pinto H, Cryer D, Cusi K, El-Kassas M, Klein S, Eskridge W, Fan J, Gawrieh S, Guy CD, Harrison SA, Kim SU, Koot B, Korenjak M, Kowdley K, Lacaille F, Loomba R, Mitchell-Thain R, Morgan TR, Powell E, Roden M, Romero-Gómez M, Silva M, Singh SP, Sookoian SC, Spearman CW, Tiniakos D, Valenti L, Vos MB, Wai-Sun Wong V, Xanthakos S, Yilmaz Y, Younossi Z, Hobbs A, Villota-Rivas M, Newsome PN; NAFLD

Nomenclature consensus group. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol*. 2023 Jun;S0168-8278(23)00418:1-53.

Roberts MC, Fohner AE, Landry L, Olstad DL, Smit AK, Turbitt E, Allen CG. Advancing precision public health using human genomics: examples from the field and future research opportunities. *Genome Med*. 2021 Jun;13(97):1-10.

Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. *Science*. 2002 Dec;298(5602):2381-5.

Roudot-Thoraval F. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021 May;45(101596):1-6.

Roy N, Prasad C, Kumar A, Mondol K, Jain K, Yadav R, Jha JK, Nadda N, Acharya SK, Shalimar, Nayak B. *IFNL4* haplotype, linkage disequilibrium and their influence on virological response to hepatitis C virus infection in Indian population. *Virusdisease*. 2019 Sep;30(3):344-53.

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 Mar;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 May;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 Jan;29(1):123-9.

Ryckman K, Williams SM. Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies. *Curr Protoc Hum Genet*. 2008;Chapter 1:Unit 1.18.

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 Nov;8(6):655-61.

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

Schelbert S, Schindeldecker M, Drebber U, Witzel HR, Weinmann A, Dries V, Schirmacher P, Roth W, Straub BK. Lipid droplet-associated proteins perilipin 1 and 2: molecular markers of steatosis and microvesicular steatotic foci in chronic hepatitis C. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec;23(15456):1-20.

Scott N, Wilson DP, Thompson AJ, Barnes E, El-Sayed M, Benzaken AS, Drummer HE, Hellard ME. The case for a universal hepatitis C vaccine to achieve hepatitis C elimination. *BMC Med.* 2019 Sep;17(175):1-12.

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

Shawky MA, Mohammed AQ, Hassan AM, Ali BH, Moustafa HM. Insulin resistance in nondiabetic Egyptian patients with chronic hepatitis C virus. *Rev Gastroenterol Mex.* 2020 Apr-Jun;85(2):173-9.

Sheridan DA, Shawa IT, Thomas EL, Felmlee DJ, Bridge SH, Neely D, Cobbold JF, Holmes E, Bassendine MF, Taylor-Robinson SD. Infection with the hepatitis C virus causes viral genotype-specific differences in cholesterol metabolism and hepatic steatosis. *Sci Rep.* 2022 Apr;12(5562):1-11.

Shiffman ML, Benhamou Y. Cure of HCV related liver disease. *Liver Int.* 2015 Jan;35(S1):71-7.

Shoulders CC, Narcisi TM, Read J, Chester A, Brett DJ, Scott J, Anderson TA, Levitt DG, Banaszak LJ. The abetalipoproteinemia gene is a member of the vitellogenin family and encodes an alpha-helical domain. *Nat Struct Biol.* 1994 May;1(5):285-6.

Siqueira ER, Oliveira CP, Correa-Giannella ML, Stefano JT, Cavaleiro AM, Fortes MA, Muniz MT, Silva FS, Pereira LM, Carrilho FJ. MTP -493G/T gene polymorphism is associated with steatosis in hepatitis C-infected patients. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Jan;45(1):72-7.

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 Jan;59(1):318-27.

Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006 Aug;22(15):1928-9.

Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet.* 2019 Oct;394(10207):1451-66.

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

Sved JA, Hill WG. One Hundred Years of Linkage Disequilibrium. *Genetics.* 2018 Jul;209(3):629-36.

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 Jul;64(Pt 4):269-76.

Tan J, Zhang J, Zhao Z, Zhang J, Dong M, Ma X, Liu S, Xin Y. The association between SNPs rs1800591 and rs3816873 of the MTTP gene and nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Saudi J Gastroenterol*. 2020 Jul;26(4):171-8.

Tao Y, Han X, Liu N, Shi L, Shi L, Liu S, Yao Y. Association study of TAP and HLA-I gene combination with chronic hepatitis C virus infection in a Han population in China. *Int J Immunogenet*. 2022 Jun;49(3):169-80.

Thakkestian A, McElduff P, D'Este C, Duffy D, Attia J. A method for meta-analysis of molecular association studies. *Stat Med*. 2005 May;24(9):1291-306.

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

Toro DM, Ramasawmy R, Silva Neto PV, Pereira GL, Sarmiento PS, Dray HLSN, Sousa KS, Affonso JS, Silva JA, Garcia NP, Barbieri MV, Victória FS, Donadi EA, Costa AG, Ogusku MM, Sadahiro A, Tarragô AM, Malheiro A. Inflammasome genes polymorphisms may influence the development of hepatitis C in the Amazonas, Brazil. *PLoS One*. 2021 Jun;16(e0253470):1-14.

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 Mar;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 Dec;61(6):628-32.

Wang CC, Cheng PN, Kao JH. Systematic review: chronic viral hepatitis and metabolic derangement. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020 Jan;51(2):216-30.

Waples RS. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? *J Hered*. 2015 Jan-Feb;106(1):1-19.

Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. *Lancet*. 2015 Mar;385(9973):1124-35.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014 Nov;61(S1):S58-S68.

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

Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet*. 2005 May;76(5):887-93.

Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. *Am Fam Physician*. 2015 Jun;91(12):835-42.

Wolff E, Vergnes MF, Defoort C, Planells R, Portugal H, Nicolay A, Lairon D. Cholesterol absorption status and fasting plasma cholesterol are modulated by the microsomal triacylglycerol transfer protein -493 G/T polymorphism and the usual diet in women. *Genes Nutr*. 2011 Feb;6(1):71-9.

Wong AK, Sealfon RSG, Theesfeld CL, Troyanskaya OG. Decoding disease: from genomes to networks to phenotypes. *Nat Rev Genet*. 2021 Dec;22(12):774-90.

World Health Organization – WHO. Hepatitis C. Atualizado em julho de 2023, [acesso em 01 de agosto de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.

Ximenes RA, Pereira LM, Martelli CM, Merchán-Hamann E, Stein AT, Figueiredo GM, Braga MC, Montarroyos UR, Brasil LM, Turchi MD, Fonseca JC, Lima ML, Alencar LC, Costa M, Coral G, Moreira RC, Cardoso MR. Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2010 Sep;26(9):1693-704.

Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73-84.

Zák A, Jáchymová M, Tvrzická E, Vecka M, Duffková L, Zeman M, Slabý A, Stanková B. The influence of polymorphism of -493G/T MTP gene promoter and metabolic syndrome on lipids, fatty acids and oxidative stress. *J Nutr Biochem*. 2008 Sep;19(9):634-41.

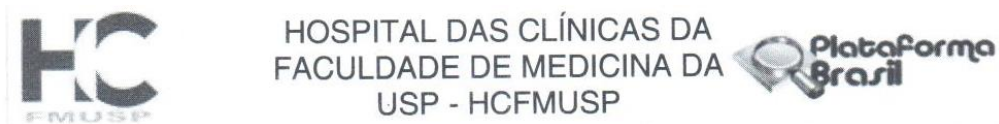
Zampino R, Ingrosso D, Durante-Mangoni E, Capasso R, Tripodi MF, Restivo L, Zappia V, Ruggiero G, Adinolfi LE. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) -493G/T gene polymorphism contributes to fat liver accumulation in HCV genotype 3 infected patients. *J Viral Hepat*. 2008 Oct;15(10):740-6.

Zarębska-Michaluk D. Genotype 3-hepatitis C virus' last line of defense. *World J Gastroenterol*. 2021 Mar;27(11):1006-21.

Zeng KY, Bao WY, Wang YH, Liao M, Yang J, Huang JY, Lu Q. Non-invasive evaluation of liver steatosis with imaging modalities: New techniques and applications. *World J Gastroenterol*. 2023 May;29(17):2534-50.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Alterações genéticas no gene MTP 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:

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 progridem 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

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.645.384

secreção de triglicerídeos, a degradação de triglicerídeos, e aumentando a lipogênese (Negro, 2010). A esteatose hepática na infecção pelo HCV é complexa e envolve fatores virais e do hospedeiro. Dentre os fatores virais, todos os genótipos podem influenciar a esteatose, em especial o genótipo 3 do HCV, onde se observa esteatose um tanto mais prevalente e mais severa em extensão do que a observada na infecção de genótipos não 3 (Adinolfi et al., 2013). Os níveis de RNA do HCV no soro e a proteína do core também estão associados com a progressão da esteatose, pois parecem prejudicar a secreção de algumas lipoproteínas. Dentre os fatores do hospedeiro que interferem na progressão da esteatose são relatados o índice de massa corporal (IMC), consumo excessivo de álcool, obesidade e determinantes genéticos como os polimorfismos nos genes MTTP (proteína de transferência de triglicerídeo microsossomal) e PNPLA3 ("patatin-like phospholipase- 3") (Perlemuter et al., 2002, Valenti et al., 2011, Adinolfi et al., 2013). Em relação aos determinantes genéticos da esteatose hepática, destacaremos as alterações genéticas (polimorfismos) presentes no gene MTTP. A MTTP é uma proteína heterodimérica e está localizada em elevada concentração no lúmen do retículo endoplasmático em órgãos como o fígado, intestino e o coração. A função da MTTP está relacionada com a montagem e secreção de lipoproteínas de baixa densidade, como o VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) (Zampino et al. 2008, Adinolfi et al., 2013, Saad et al., 2014). Acredita-se que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene MTTP podem alterar a concentração de lipídeos, como por exemplo, o VLDL, o que pode aumentar a degradação da apoB-lipoproteína e resultar na desregulação do metabolismo dos lípidos hepático. Esse é um fator que poderia explicar as diferenças inter-individuais em risco de DHGNA (Di Filippo et al., 2012). Como citado anteriormente, além dos SNPs no gene MTTP, a presença do vírus da hepatite pode influenciar na concentração de lipídeos, e resultar na esteatose hepática. Sabe-se que pacientes com hepatite C crônica tem maior chance de desenvolver esteatose hepática do que indivíduos saudáveis (Negro, 2010). Foi detectado um polimorfismo funcional em uma região promotora do gene MTTP (-493 G/T), importante na regulação da expressão do gene MTTP e que influencia na concentração de colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade) no plasma (Karpe et al, 1998). Com base nesse estudo surgiram novos trabalhos que investigaram a associação do polimorfismo -493 GT do gene MTTP com diversas patologias (Bernard et al. de 2000, Namikawa et al, 2004, Gambino et al., 2007). Zheng et al. (2014) e Li et al. (2014) realizaram uma meta-análise que teve como objetivo investigar o polimorfismo -493G>T no gene MTTP como um potencial fator de risco para a DHGNA, que é definida como o acúmulo de gordura no fígado, na ausência de excesso de consumo de álcool e de qualquer causa secundária. Os resultados da meta-análise revelaram que o polimorfismo -493

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.645.384

G>T foi fortemente correlacionado com um aumento do risco de esteatose hepática, podendo contribuir para a vulnerabilidade dos indivíduos com DHGNA (Zheng et al, 2014, Li et al, 2014). Em relação aos pacientes com hepatite C crônica, estudo mostrou uma atividade reduzida de MTTP, o que foi associado à esteatose hepática genótipo-dependente, ou seja, um efeito viral direto foi observado em infecção por HCV genótipo 3, enquanto que a hiperinsulinemia parece modular a expressão de MTTP em HCV genótipos não-3 (Mirandola et al., 2006). Zampino et al. (2008) encontraram dentre seus resultados que os pacientes com HCV genótipo 3 pacientes portadores do alelo T do polimorfismo do gene MTTP apresentaram maior grau de esteatose do que os portadores do genótipo GG (Zampino et al., 2008). Um outro estudo determinou o padrão de polimorfismo -493G/T do gene MTTP nos pacientes com hepatite C crônica com genótipo 4. Uma predominância significativa do alelo G nos pacientes com HCV em relação ao controle (indivíduos saudáveis). Fibroses leves e moderadas foram associadas com padrão GG do polimorfismo em comparação com padrão GT e TT que foi associado com fibrose grave e cirrose (F3- F4) (Saad et al., 2014). No estudo de Mirandola et al. (2009) com indivíduos com HCV de diferentes lugares da Europa, os resultados indicaram que idade, IMC, HCV genótipo 3 e o alelo T MTTP foram fatores de risco independentes para os graus de esteatose mais avançada. Além disso, os portadores TT tinham maiores níveis de lipoproteína de alta densidade e da apo-lipoproteína AI do que os níveis de portadores do alelo G. Concluíram assim que o polimorfismo 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 a prevalência de esteatose de 45,3% e a de fibrose grau 0-1 foi de 50%, grau 2 foi de 29% e de grau 3 foi de 20,9%. Trata-se de um estudo com pacientes HCV de vários genótipos. Por fim, relataram que o polimorfismo funcional -493 G/T do gene MTTP não desempenhou influência no desenvolvimento da esteatose hepática e da fibrose (Petit et al., 2006). Além do polimorfismo -493 G/T, outros polimorfismos foram encontrados no gene MTTP e também podem estar relacionados com alterações na concentração de lipídeos (Talmud et al., 2000, Ledmyr et al., 2006, Bohme et al., 2008, Peng et al., 2014, Hsiao et al., 2015). Acredita-se que variações no gene MTTP podem modular a função ou os níveis da produção e secreção de apoB-lipoproteína contendo lipoproteína e, assim, contribuir para a variação nos níveis de lipídeos (Talmud et al., 2000). Segundo Hsiao et al. (2015), polimorfismos no gene MTTP poderiam modular a homeostase lipídica para determinar os lipídeos séricos e o risco de DHGNA (Hsiao et al., 2015). Talmud et al. (2000) descreveram que homocigose para o polimorfismo 297Q em elevados níveis triglicéridos ou em combinação com -493G>T, foi associada com um efeito de aumento sobre os níveis de apoB-lipoproteína, sugerindo

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.645.384

a importância de diferenças modestas na atividade da MTTP na determinação da secreção hepática de lipoproteínas em homens saudáveis (Talmud et al., 2000). Outro estudo mostrou que indivíduos homocigotos para os alelos menos comuns -493 T, -164 C, e T 128 no gene MTTP, apresentaram níveis significativamente mais baixos de colesterol total e de LDL colesterol e de LDL apor-lipoproteína no plasma, e também apresentaram índice de massa corporal (IMC) e níveis plasmáticos de insulina significativamente maior em comparação com os indivíduos portadores dos alelos comuns (Ledmyr et al., 2006). Um grande estudo de base populacional conduzido na Alemanha forneceu evidências de que o alelo menos comum do polimorfismo H297Q do gene MTTP está associado com menor IMC, circunferência da cintura e colesterol total em mulheres, mas não em homens (Bohme et al., 2008). Outro estudo mostrou que esse mesmo polimorfismo (297H) interagiu com idade, resistência à insulina e IMC para diminuir níveis séricos de apoB contendo lipoproteínas (LDL-Colesterol e não-HDL-Colesterol - lipoproteínas de alta densidade), mas aumentando o risco de formação de DHGNA (Hsiao et al., 2015). Estudo de Peng et al. (2014) encontrou na análise de regressão logística multivariada, que o SNP -164 T/C foi associado a um risco aumentado de DHGNA, enquanto os SNPs rs1057613 A/G e rs3805335 C/T foram associados com uma diminuição do risco de DHGNA (Peng et al., 2014). Ainda não se sabe se existe ou não uma relação entre esses SNPs do gene MTTP e a susceptibilidade para esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica. Por tanto, visto que ainda não estão bem estabelecidas essas associações, foram selecionados os polimorfismos -400 A/T, - 164 T/C, Q/H 95, I/T 128, Q/E 244 e H/Q 297 do gene MTTP para que seja analisado se possuem influência na esteatose hepática associada ao HCV (visto que o polimorfismo -493 G/T será estudado em outro projeto de pesquisa do grupo). Por fim, analisar se estes seriam possíveis biomarcadores importantes para a detecção precoce da esteatose hepática em pacientes com hepatite C crônica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar a presença dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -400 A/T, -164 T/C, Q/H 95, I/T 128, Q/E 244 e H/Q 297 do gene proteína de transferência do triglicéride microssomal (MTTP) em pacientes com 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), São Paulo.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.645.384

Avaliar a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -400 A/T, -164 T/C, Q/H 95, I/T 128, Q/E 244 e H/Q 297 do gene proteína de transferência do triglicéride microsomal (MTTP) na esteatose hepática e nos níveis de lipídeos plasmáticos em pacientes com hepatite C crônica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá nenhum desconforto ou risco, pois não haverá nenhum procedimento novo. Trata-se de estudo retrospectivo de material coletado para o projeto de pesquisa intitulado "Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal". Esse material (soro) está armazenado no Laboratório de Hepatologia por vírus (LIM-47) em freezer -80°C.

Benefícios:

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

Data de Submissão do Projeto: 06/07/2016 Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_693415.pdf Versão do Projeto: 1
Página 4 de 7

pacientes com hepatite C crônica. No momento, não há benefício direto para os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não apresenta óbices que impeçam sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 1.645.384

e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_693415.pdf	06/07/2016 10:56:57		Aceito
Outros	Parecer_DMIP_06_05_2016.pdf	06/07/2016 10:38:03	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Cadastro_Pesquisa_CAPPesq.pdf	06/07/2016 10:35:29	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_06_07_2016.pdf	06/07/2016 10:34:41	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Mariana_Cavalheiro_Magri.pdf	05/07/2016 15:57:55	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_uso_soro.pdf	08/04/2016 15:51:32	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mariana_Cavalheiro_Magri.pdf	08/04/2016 15:50:54	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Julho de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSÉ MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para portadores crônicos do HCV

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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: cappesq.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: ____/____/____

**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 DDD (.....)**

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M F
DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... **Nº**.....**APTO:**
BAIRRO:**CIDADE:**
CEP:**TELEFONE DDD (.....)**

ANEXO C – Aprovação de emenda ao projeto pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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: 2

CAAE: 57626816.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.779.235

Apresentação do Projeto:

A emenda trata da inclusão no estudo inicial de um grupo de 241 indivíduos saudáveis do mesmo município, São Paulo, para realização da genotipagem dos SNPs -400 A/T, -164 T/C, Q/H 95, I/T 128, Q/E 244, -493 GT e H/Q 297 do gene MTTP utilizando a mesma metodologia já descrita no projeto.

Objetivo da Pesquisa:

A justificativa da inclusão dessa emenda é a necessidade de conhecer a frequência desses SNPs em uma população saudável do Brasil, e comparar suas distribuições com a encontrada nos pacientes com hepatite C crônica do estudo inicial.

Objetivo Primário:

Detectar a presença dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -400 A/T, -164 T/C, Q/H 95, I/T 128, Q/E 244 e H/Q 297 do gene proteína de transferência do triglicéride microsomal (MTTP) em pacientes com 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 (HC-FMUSP), São Paulo.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.779.235

Objetivo Secundário:

Avaliar a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -400 A/T, -164 T/C, Q/H 95, I/T 128, Q/E 244 e H/Q 297 do gene proteína de transferência do triglicéride microsomal (MTTP) na esteatose hepática e nos níveis de lipídeos plasmáticos em pacientes com hepatite C crônica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não haverá nenhum desconforto ou risco, pois não haverá nenhum procedimento novo. Trata-se de estudo retrospectivo de material coletado para o projeto de pesquisa intitulado "Manifestações extra-hepáticas da hepatite C – estudo transversal". Esse material (soro) está armazenado no Laboratório de Hepatologia por vírus (LIM-47) em freezer -80°C.

Benefícios: 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. No momento, não há benefício direto para os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram todos apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta óbices éticos que impeçam sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Pode ser aprovado com anuência do plenário.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1160826_E1.pdf	19/06/2018 11:26:45		Aceito
Outros	Termo_Anuencia_Dra_Gerusa.pdf	19/06/2018 11:20:53	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Formulario_submissao_emendas.pdf	19/06/2018	Mariana Cavalheiro	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º 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



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.779.235

Outros	Formulario_submissao_emendas.pdf	11:20:22	Magri	Aceito
Outros	Parecer_Emenda_DMIP_13_06_2018.pdf	18/06/2018 10:33:28	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Emenda.pdf	18/06/2018 10:33:07	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Parecer_DMIP_06_05_2016.pdf	06/07/2016 10:38:03	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Cadastro_Pesquisa_CAPPesq.pdf	06/07/2016 10:35:29	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_06_07_2016.pdf	06/07/2016 10:34:41	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Mariana_Cavalheiro_Magri.pdf	05/07/2016 15:57:55	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_uso_soro.pdf	08/04/2016 15:51:32	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mariana_Cavalheiro_Magri.pdf	08/04/2016 15:50:54	Mariana Cavalheiro Magri	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Julho de 2018

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO D – Folha de rosto da publicação referente à tese

Clinics 77 (2022) 100094

CLINICS

OFFICIAL SCIENTIFIC JOURNAL
OF FACULDADE DE MEDICINA
AND HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - SÃO PAULO, BRAZIL

CLINICS

journal homepage: <https://www.journals.elsevier.com/clinics>

Original articles

Effect of *MTTP* -493G/T, I128T, Q95H and Q244E polymorphisms on hepatic steatosis in patients with chronic hepatitisThamiris Vaz Gago Prata^a, Caroline Manchiero^a, Bianca Peixoto Dantas^a,
Arielle Karen da Silva Nunes^a, Fátima Mitiko Tengan^{a,b}, Mariana Cavalheiro Magri^{a,*}^a Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus (LIM-47), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil^b Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Important etiologies of chronic liver disease are viral hepatitis.
- Viral hepatitis B and C causes 1.1 million deaths per year.
- Hepatic steatosis (liver fat accumulation) is a metabolic complication of hepatitis C.
- The underlying mechanisms involving steatosis include genetic polymorphisms.
- -493G/T and I128T polymorphisms in the *MTTP* gene are relevant in hepatic steatosis.

ARTICLE INFO

Keywords:

Chronic hepatitis C

Genetic models of inheritance

Hepatic steatosis

Microsomal Triglyceride Transfer Protein (*MTTP*)

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

ABSTRACT

Background: Chronic hepatitis C is characterized by a progressive deterioration of liver function and is involved in metabolic complications, such as hepatic steatosis.**Objective:** The aim of this study was to investigate the role of host and viral characteristics associated with -493G/T (rs1800591), I128T (rs3816873), Q95H (rs61733139), and Q244E (rs17599091) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the *Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP)* gene on hepatic steatosis in chronic hepatitis C.**Methods:** SNPs were genotyped by PCR-RFLP and analyzed in combination with host and viral characteristics by multiple logistic regression in different genetic models of inheritance.**Results:** The authors analyzed 236 patients with chronic hepatitis C, and 53% had hepatic steatosis. The mutated allele frequencies were > 5%, and the genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p \geq 0.05$). It was observed that patients with HCV genotype 3 infection (OR = 2.74, 95% CI 1.24–6.06, $p = 0.013$), female sex (OR = 2.28, 95% CI 1.21–4.28, $p = 0.011$) and moderate- and high-intensity liver inflammatory activity (A2-A3) (OR = 3.61, 95% CI 1.86–7.01, $p < 0.001$) alone exhibited a higher risk of steatosis. The results of multiple logistic regression analysis for interaction showed that for the -493G/T SNP, when the GT/TT genotype (dominant model) and the GT genotype (codominant model) were each combined with HCV genotype 3 infection, an 11.51-fold (95% CI 2.08–63.59, $p = 0.005$) and a 15.69-fold (95% CI 2.46–99.85, $p = 0.004$) increased risk of steatosis, respectively, was observed. For the I128T SNP, when both the IT/TT genotype (dominant model) and the IT genotype (codominant model) were combined with HCV genotype 3 infection, an 8.51-fold (95% CI 1.59–45.54, $p = 0.012$) and an 8.40 fold (95% CI 1.51–46.91, $p = 0.015$) increased risk of steatosis, respectively, was observed.**Conclusion:** The present study showed that the viral genotype combined with the -493G/T and I128T SNPs in the *MTTP* gene influences hepatic steatosis.

*Corresponding author.

E-mail address: mariana.magri@hc.fm.usp.br (M.C. Magri).<https://doi.org/10.1016/j.clinic.2022.100094>

Received 15 March 2022; Revised 21 June 2022; Accepted 12 July 2022

1807-5932/© 2022 HCFMUSP. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)