

ERIKA RABELO FORTE DE SIQUEIRA

Avaliação do polimorfismo C677T (ALA222VAL) do gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase (*MTHFR*) da homocisteína e -493G/T do gene da proteína microssomal transportadora de triglicerídeos (MTP) em pacientes com hepatite C crônica do Nordeste do Brasil

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

Programa: Gastroenterologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Flair José Carrilho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira

**SÃO PAULO
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Siqueira, Erika Rabelo Forte de

Avaliação do polimorfismo C677T (ALA222VAL) do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) da homocisteína e -493G/T do gene da proteína microssomal transportadora de triglicerídeos (MTP) em pacientes com hepatite C crônica do Nordeste do Brasil / Erika Rabelo Forte de Siqueira-- São Paulo, 2011.

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

Programa de Gastroenterologia Clínica.

Orientador: Flair José Carrilho.

Co-orientadora: Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira.

Descritores: 1.Hepatite C crônica 2.Fibrose 3.Proteína microssomal transportadora de triglicerídeos 4.Metilenotetrahidrofolato redutase 5.Homocisteína

USP/FM/DBD-005/11

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e minha irmã,
pelo apoio e carinho.*

*Ao meu marido,
pela paciência e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pelas oportunidades e por sempre estar presente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, **Argemiro e Socorro**, por fazerem parte da minha vida, incentivando a cada dia o meu crescimento profissional, emocional e espiritual. Não tenho palavras para descrever a minha eterna gratidão; seus ensinamentos guardarei por toda a vida.

À minha querida irmã, **Elisa**, pela companhia nas viagens e pelo apoio técnico durante a minha limitação física.

Ao meu marido, **Antonio Jorge**, por compartilhar comigo cada etapa de crescimento profissional, entendendo minhas ausências e colaborando no entendimento das análises matemáticas, para que eu pudesse traduzir em palavras todas as interpretações deste trabalho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Flair José Carrilho** e à minha co-orientadora, **Profa. Dra. Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira**, pela oportunidade e todo o apoio fornecido durante a execução e elaboração dessa tese.

Em especial, àqueles que, sem dúvida, tornaram este trabalho possível: ao Instituto do Fígado de Pernambuco, na pessoa da **Profa. Dra. Leila Maria Moreira Beltrão Pereira**, pela paciência e incentivo às pesquisas na área da Hepatologia Clínica, e também à Disciplina de Bioquímica da Universidade de Pernambuco, na pessoa da **Profa. Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz**, pelo constante incentivo científico, desde a época da graduação em Medicina. Ambas sempre presentes durante minha trajetória acadêmica. Obrigada por sempre terem confiado em mim.

Ao **Dr. Fernando Nunes**, Secretário de Administração da Prefeitura da Cidade do Recife, pela confiança e apoio para continuação desse trabalho.

Ao grupo da Gerência de Atenção e Assistência Ambulatorial e Hospitalar da Prefeitura da Cidade do Recife, nas pessoas **Dra. Kátia Guimarães e Dra. Flávia Villa-Chan**, pela constante compreensão, atenção, carinho e paciência durante a etapa final de conclusão desse trabalho.

Às novas e verdadeiras amigas construídas durante todo esse período das idas e vindas a São Paulo: **Maria Luiza da Nova, Alessandra Pontilho, Vicência Mara Rodrigues de Lima e José Tadeu Stefano**. Muito obrigada por todo o apoio e carinho.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia do HUOC/UPE, nas pessoas de **Filipe, Lais e Karina**.

Às secretárias **Cláudia de Arruda, Fabiana Renata Soares Bispo e Fátima Gomes**, que tanto me auxiliaram, mesmo à distância, sendo sempre prestativas e atenciosas.

Meu agradecimento em especial a todos os **PACIENTES** com hepatite C crônica que, voluntariamente, contribuíram para a realização deste estudo, os quais sempre serão a motivação para novas pesquisas.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Fisiopatogenia e epidemiologia do vírus da hepatite C.....	02
1.2 Hepatite C, esteatose e resistência insulínica.....	03
1.3 Hepatite C e metilenotetrahidrofolato redutase (<i>MTHFR</i>).....	06
1.4 Hepatite C e proteína microsomal transportadora de triglicerídeos <i>MTP</i>).....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivos primários.....	14
2.2 Objetivos secundários.....	14
3 MÉTODO.....	15
3.1 Considerações éticas.....	16
3.2 População.....	16
3.2.1 Critérios de inclusão.....	16
3.2.2 Critérios de exclusão.....	17
3.3 Delineamento experimental.....	18
3.4 Avaliação clínica.....	18
3.5 Determinações bioquímicas.....	19
3.6 Análise do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (<i>MTHFR</i>)	20
3.6.1 Extração do DNA.....	20
3.6.2 Amplificação do DNA.....	21
3.6.3 Genotipagem do gene C677T da <i>MTHFR</i>	22
3.7 Análise do polimorfismo -493G/T do gene da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (<i>MTP</i>)	23
3.7.1 Genotipagem do gene -493G/T da <i>MTP</i>	24
3.8 Avaliação histológica.....	25
3.9 Análise estatística.....	26

4 RESULTADOS.....	27
4.1 Frequência do C677T do gene da <i>MTHFR</i> em pacientes com hepatite C crônica.....	28
4.2 Frequência do -493G/T do gene da <i>MTP</i> em pacientes com hepatite C crônica.....	31
4.3 Dados clínicos e laboratoriais	34
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	47
7 ANEXOS.....	50
7.1 Ficha cadastral do protocolo de pesquisa.....	51
7.2 Termo de consentimento livre esclarecido.....	53
7.3 Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq.....	57
7.4 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - CEP/HUOC.....	58
8 REFERÊNCIAS.....	59

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
Apo B	apolipoproteína B
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
BA	Bahia
BHMT	betaína homocisteína metiltransferase
B6	piridoxina
B12	metilcobalamina
CBS	cistationina-beta-sintetase
CTGF	fator de crescimento do tecido conectivo
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DMAA	dimetilarginina
DNase	desoxirribonuclease
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DM	diabetes mellitus
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHNA	esteato-hepatite não alcoólica
EROS	espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
et al.	<i>et alii</i> (e outros)
F	feminino
FA	fosfatase alcalina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCC	hepatocarcinoma
Hcy	homocisteína
HDL	lipoproteína de alta densidade
HE	hematoxilina-eosina
HHe	hiperhomocisteinemia
Hinfi I	<i>Haemofilus influenzae I</i>

HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
H₂O	água
IC	intervalo de confiança
IFP	Instituto do Fígado de Pernambuco
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de massa corporal
IRS-1	inibição da fosforilação de substratos 1 do receptor de insulina
IRS-2	inibição da fosforilação de substratos 2 do receptor de insulina
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LDL	lipoproteína de baixa densidade
M	masculino
MgCl	cloreto de magnésio
MS	metionina sintase
MTP	proteína microsossal transportadora de lipídios
MTHFR	metileno tetrahidrofolato redutase
NaCl	cloreto de sódio
ON	óxido nítrico
ONS	óxido nítrico sintase
PCR	reação de polimerase em cadeia
PDI	proteína dissulfeto isomerase
PE	Pernambuco
PPARα	receptor ativador do proliferador de peroxissoma alfa
RE	retículo endoplasmático
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RI	resistência insulínica
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RPM	rotação por minuto
SAM	s-adenosilmetionina
SAH	s-adenosilhomocisteína
SDS	dodecilsulfato de sódio
VHC	vírus da hepatite C

VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
UPE	Universidade de Pernambuco
TE	Tris EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
THF	Tetrahidrofolato
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UV	ultravioleta
γGT	gama-glutamil transferase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
<	menor
=	igual
>	maior
≤	menor que ou igual a
≥	maior que ou igual a
°C	graus Celsius
μL	microlitro
μmol/L	micromol por litro
μU/mL	microunidades por mililitro
g/dL	grama por decilitro
h	hora
mg/dL	miligrama por decilitro
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
ng/mL	nanograma por mililitro
nm	nanômetros
p	significância estatística
pb	pares de base
pmol	picomol
s	segundo
UI/mL	unidades internacionais por mililitro
α	alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição da frequência dos genótipos e do alelo do polimorfismo C677T no gene da <i>MTHFR</i> dos pacientes com hepatite C crônica e dos controles.....	28
Tabela 2- Frequência do alelo e do genótipo do polimorfismo C677T no gene da <i>MTHFR</i> dos pacientes com hepatite C crônica segundo a classificação histológica e o genótipo do VHC.....	29
Tabela 3- Frequência do genótipo do polimorfismo C677T no gene da <i>MTHFR</i> dos pacientes com hepatite C crônica segundo classificação histológica e do genótipo do VHC.....	30
Tabela 4: Análise de regressão logística entre esteatose hepática, sexo, HOMA, perfil lipídico e presença do gene <i>MTHFR</i> em pacientes portadores de hepatite C crônica.....	30
Tabela 5: Análise de regressão logística entre fibrose 3+4, sexo, HOMA, perfil lipídico e presença do gene <i>MTHFR</i> em pacientes portadores de hepatite C crônica.....	31
Tabela 6: Distribuição da frequência dos genótipos e do alelo do polimorfismo -493G/T da <i>MTP</i> dos pacientes com hepatite C crônica e dos controles.....	32
Tabela 7: Frequência do genótipo do polimorfismo -493G/T da <i>MTP</i> dos pacientes com hepatite C crônica segundo a classificação histológica e o genótipo do VHC.....	32
Tabela 8. Frequência do genótipo do polimorfismo -493G/T da <i>MTP</i> dos pacientes com hepatite C crônica segundo classificação histológica e do genótipo do VHC.....	33
Tabela 9. Análise de regressão logística entre esteatose hepática, sexo, HOMA, perfil lipídico e presença do gene <i>MTP</i> em pacientes portadores de hepatite C crônica.....	34
Tabela 10. Análise de regressão logística entre Fibrose 3+4, sexo, HOMA, perfil lipídico e presença do gene <i>MTP</i> em pacientes portadores de hepatite C crônica.....	34

Tabela 11: Característica clínica e bioquímica dos pacientes com hepatite C crônica segundo classificação do genótipo do VHC.....	35
Tabela 12: Característica clínica e bioquímica dos pacientes com hepatite C crônica com fibrose hepática segundo a classificação de Metavir.....	36
Tabela 13: Característica clínica e bioquímica dos pacientes com hepatite C crônica com ou sem esteatose hepática.....	37
Tabela 14: Concentrações plasmáticas de homocisteína em pacientes com hepatite C crônica segundo classificação histológica e do genótipo do VHC.....	38
Tabela 15: Características clínicas e bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica em relação ao polimorfismo 677C/T da MTHFR.....	38
Tabela 16: Características bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica em relação ao polimorfismo -493G/T da <i>MTP</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alteração no metabolismo dos lipídios e acúmulo de gordura nos hepatócitos induzido pelo vírus da hepatite C.....	5
Figura 2 – Junção de duas vias metabólicas, a transulfuração da cisteína e a remetilação da metionina, no metabolismo da homocisteína.....	8
Figura 3 – Mecanismos de disfunção endotelial, aterosclerose e trombose associados à hiperhomocisteinemia.....	9
Figura 4 – Transporte intracelular de triglicerídeos, incorporação da ApoB e exportação para o plasma sob a forma de VLDL, através da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (<i>MTP</i>).....	11
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 3% mostrando o produto digerido pela enzima <i>Hinf</i> I. Observa-se na sequência (L) marcador de peso molecular 1Kb, genótipo TT (175pb e 23pb); 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Genótipo CC (198pb); 9. Genótipo CT (198, 175pb e 23pb).....	23
Figura 6 – Eletroferogramas dos genótipos da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos <i>MTP</i> . Genótipo homozigoto mutante (GG), heterozigoto (GT) e homozigoto normal (TT).....	25

RESUMO

Siqueira ERF. *Avaliação do polimorfismo C677T (ALA222VAL) do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) da homocisteína e -493G/T do gene da proteína microsossomal transportadora de triglicerídeos (MTP) em pacientes com hepatite C crônica do Nordeste do Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) está associada à presença da resistência insulínica e da esteatose hepática, independentemente dos fatores metabólicos do hospedeiro. A alteração na enzima *MTHFR* resulta em hiperhomocisteinemia, que altera o metabolismo intracelular dos lipídios e pode estar relacionada à esteatose hepática e à fibrose, em portadores do VHC. A redução da atividade hepática da *MTP* resulta em acúmulo de gordura nos hepatócitos, contribuindo para a severidade da esteatose hepática e da fibrose em portadores do VHC. Como objetivos foram estudados os polimorfismos 677 C/T do gene da *MTHFR* e -493 G/T do gene da *MTP* e sua relação com as variáveis clínicas, bioquímicas e histológicas em pacientes com infecção crônica pelo VHC. **Métodos:** 174 pacientes sem tratamento prévio com RNA do VHC positivo e com biópsia hepática foram genotipados para o polimorfismo 677C/T da *MTHFR* por *Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain* (PCR-RFLP) e para -493G/T da *MTP*, por sequenciamento. Todos os pacientes tinham marcadores negativos para doença de Wilson, hemocromatose e doença autoimune, e também tinham baixa ingestão alcoólica, com menos de 100g/semana. Variáveis bioquímicas foram analisadas no momento da realização da biópsia hepática. **Resultados:** A frequência do genótipo TT do gene *MTHFR* foi de 9,8% nos pacientes com genótipo não 1 do VHC. No entanto, foi encontrada associação entre o genótipo TT x CT /CC do polimorfismo do gene *MTHFR*, com o grau de esteatose e fibrose em ambos os genótipos da hepatite C ($p < 0,05$). Uma diferença significativa foi encontrada em níveis plasmáticos de homocisteína em pacientes com esteatose ($p = 0,03$). A frequência do genótipo GG+GT do gene *MTP* foi de 56,8% nos pacientes com genótipo 1 do VHC com fibrose hepática grau 3+4 (OR 1,8, IC 95% 1,3-2,3). Foi observada uma associação direta entre a presença da esteatose hepática nos pacientes com VHC com o genótipo GG+GT do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* independentemente do genótipo do VHC (OR = 0,4, IC 95% 0,2-0,8, $p = 0,01$). **Conclusões:** o genótipo TT do polimorfismo C677T do gene da *MTHFR* foi mais frequente no genótipo não 1 do VHC, independentemente da classificação histopatológica, assim como a frequência do genótipo CT + TT na presença de fibrose grau 1+ 2 e da esteatose hepática. A hiperhomocisteinemia foi altamente prevalente em indivíduos com esteatose. Por outro lado, a presença do alelo G do do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* está associada a uma menor expressão da *MTP* hepática, protegendo contra a esteatose em pacientes com VHC do Nordeste do Brasil. Estudos adicionais em outras populações são necessários para avaliar melhor o papel desses polimorfismos em indivíduos infectados pelo VHC.

Descritores: 1. Hepatite C crônica 2.Fibrose 3.Proteína microsossomal transportadora de triglicerídeos 4.Metilenotetrahidrofolato redutase 5.Homocisteína

SUMMARY

Siqueira ERF. *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T (ALA222VAL) polymorphism and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) -493G/T polymorphism in chronic hepatitis C patients from Northeast of Brazil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Background: Chronic hepatitis C (CHC) infection has been shown to promote insulin resistance and hepatic steatosis independent of host metabolic factors. A lower *MTHFR* activity is associated to hiperhomocysteinemia and also may be related to steatosis and fibrosis in CHC. Furthermore a reduction on hepatic *MTP* activity resulting in fatty liver and could contribute to the severity of hepatic steatosis and fibrosis in CHC. The aim was to investigate this polymorphism in the 677 C/T *MTHFR* and -493G/T *MTP* genes and there relation with metabolic and histological variables in patients with CHC. **Methods:** One hundred seven-four untreated patients with viral RNA and liver biopsy were genotyped for the 677C/T *MTHFR* and - 493G/T *MTP* polymorphisms. The 677C/T polymorphism of the *MTHFR* gene was identified by *Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain* (PCR-RFLP) and the - 493 G/T polymorphism of the *MTP* gene was determined by direct sequencing of the polymerase chain reaction products. All patients were negative for markers of Wilson's disease, hemochromatosis and autoimmune diseases and had current and past daily alcohol intake less than 100g/week. A set of metabolic markers were also measured at the time of liver biopsies. **Results:** Among subjects infected with CHC genotype non-1 the frequency of *MTHFR* genotypes TT was 9.8%. Nevertheless, association was found between the *MTHFR* genotype TT x CT/CC polymorphism and the degree of steatosis and fibrosis in both hepatitis C genotype ($p < 0.05$). A significant difference was found on plasma homocysteine levels in patients with steatosis ($p=0.03$). Among subjects infected with CHC genotype 1 with fibrosis grade 3+4 the frequency of *MTP* genotypes GG+GT was 56.8% (OR 1.8; CI 95% 1.3-2.3). Observed an association with steatosis as dependent variable identified in genotypes GG+GT as independent protective factors against steatosis (OR=0.4, CI 95% 0.2-0.8, $p = 0.01$). **Conclusion:** The presence of genotype TT of *MTHFR* C677T polymorphism was more common in CHC genotype non-1 infected patient regardless of histopathological classification and genotype CT+TT frequencies were significant in the presence of fibrosis grade 1+2 and of steatosis. On the other hand the presence of the G allele of *MTP* - 493G/T, which is possibly associated with a lower *MTP* hepatic expression, protects against steatosis in CHC patients from northeast of Brazil. Additional studies in other populations are needed to further assess the role of this polimorphism in CHC.

Descriptors: 1.Hepatitis C 2. Fibrosis 3. Microsomal triglyceride transfer protein 4. Methylenetetrahydrofolate reductase 5. Homocysteine

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fisiopatogenia e epidemiologia do vírus da hepatite C

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) atinge aproximadamente 180 milhões de pessoas em todo o mundo¹. No Brasil, dados preliminares do inquérito nacional das hepatites virais têm demonstrado, até o momento, que a prevalência global do anticorpo do VHC nos indivíduos é de 1,38%*.

O VHC é um vírus RNA, da família *Flaviviridae* e do gênero *Hepacivirus*. O genoma do VHC é composto por genes estruturais (core, E1 e E2) e não estruturais (NS2-NS5B), que são dispostos na seguinte sequência: NH2-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH².

O VHC é considerado um vírus hepatotrófico, sendo somente suscetível à infecção no homem e no chimpanzé. As partículas do vírus têm aproximadamente 35-55 nm de diâmetro e estão frequentemente associadas tanto às globulinas imunes quanto às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)^{3,4,5}.

O VHC apresenta seis diferentes genótipos e uma variação de subtipos (1a, 1b, 1c etc.). Os genótipos 1, 2 e 4 são mais encontrados no centro-oeste da África e o subtipo 4a, no Egito; o genótipo 5 é frequente no sul da África, e os genótipos 3 e 6, na China, sudeste da Ásia e na Índia⁶. No Brasil, o genótipo 1b é predominante na Região Sudeste e no norte da Amazônia, sendo na Região Sul os mais frequentes o genótipo 1 e 3. Na Região Nordeste, especialmente em Recife (PE), há uma distribuição igual entre os genótipos 1 e 3; por outro lado, em Salvador (BA), essa distribuição não é uniforme, prevalecendo o genótipo 1⁷.

* Brasil. Ministério da Saúde. Inquérito nacional de hepatites virais.

O VHC é responsável por causar lesões inflamatórias no fígado, podendo estar associado à presença de acúmulo de lipídios intra-hepáticos (esteatose) e a progressivos graus de fibrose. A longo prazo, pode desencadear cirrose hepática e carcinoma hepatocelular^{8,9}. Na evolução da hepatite C, 60%-80% dos casos progridem para forma crônica, e mais de 20% progridem para cirrose hepática. A forma aguda da infecção tem resolução espontânea em mais de 45% dos casos¹⁰.

Os principais fatores de risco relacionados à transmissão do VHC são hemotransfussões, transplante de órgãos sólidos de doadores infectados, uso de drogas ilícitas injetáveis e exposição ocupacional a sangue e derivados¹¹.

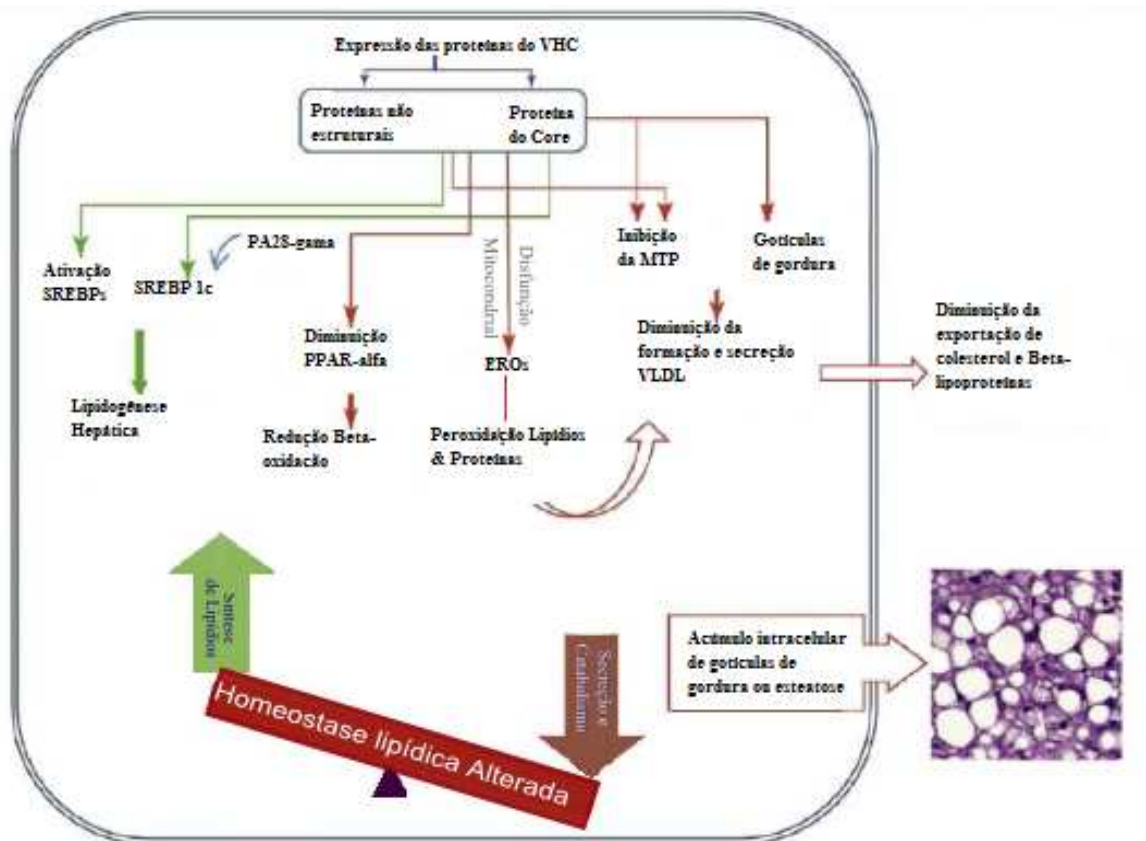
1.2 Hepatite C, esteatose e resistência insulínica

Nos últimos anos estudos têm demonstrado que a infecção crônica pelo VHC provoca uma série de manifestações extra-hepáticas, independentemente da lesão que esteja ocorrendo no fígado. A infecção pelo VHC tem sido implicada na gênese de algumas doenças extra-hepáticas, como crioglobulinemia mista essencial, porfiria cutânea tardia esporádica, doença da tireoide e glomerulonefrite¹². Recentes estudos epidemiológicos sugerem que o *diabetes mellitus* (DM) possa representar também uma manifestação da infecção crônica pelo VHC¹³. Vários autores relataram aumento na prevalência do *diabetes mellitus* tipo 2 com infecção pelo VHC^{14,15}.

Associadamente, a prevalência da esteatose em pacientes com infecção crônica do VHC é de 30% a 70%. A esteatose macrovesicular está presente nos pacientes com VHC, contudo, é mais observada na área periportal do que na região centrolobular, como é comum na Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica

(DHGNA)¹⁶. O genótipo 3 do VHC está associado à esteatose hepatocelular, sugerindo que o vírus tem um efeito esteatogênico, estando diretamente relacionado às concentrações séricas e intra-hepáticas do RNA viral e inversamente proporcional às concentrações de apolipoproteína B (Apo B)^{17,18,19}. Por outro lado, o genótipo 1 do VHC parece ser independente da carga viral e estar relacionado à obesidade, incluindo o índice de massa corporal (IMC) e a distribuição de gordura visceral²⁰.

O mecanismo pelo qual o VHC está associado à esteatose hepática ainda é desconhecido. Vários fatores, como a obesidade, a resistência à insulina e a hipertrigliceridemia, somados à presença de duas proteínas do VHC – core e NS5A – parecem ter a capacidade de alterar o metabolismo dos lipídios em células infectadas, causando esteatose hepática na ausência da resposta imune^{21,22}. O mecanismo parece envolver a ocorrência de resistência insulínica (RI), que leva a uma maior taxa de lipólise e consequente aumento do aporte hepático de ácidos graxos, que excede a capacidade de oxidação do órgão²³. Esse desequilíbrio entre captação, síntese, oxidação e exportação resulta no acúmulo intra-hepatocitário de gorduras (Figura 1). A RI, por sua vez, seria o produto da expressão aumentada da infecção crônica pelo VHC induzida por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6²⁴. Ademais, o excesso de ácidos graxos ofertados ao fígado promove a diminuição da fosforilação da tirosina, o que leva à redução da sinalização da insulina. Além disso, o VHC está associado, ainda, ao surgimento de DM, que pode ser também considerado o resultado da indução de RI²⁵.



Fonte: Adaptado. Gulam et al.³³, p.35.

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

O acúmulo de gordura no fígado não é inócua na hepatite C. A gordura torna o fígado vulnerável a endotoxinas, altera a regeneração hepática, aumenta o estresse oxidativo hepático e causa RI²⁶⁻²⁸ de forma semelhante à patogênese do DHGNA, que está relacionada à presença de RI e à presença do estresse oxidativo na evolução de esteatose para esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e fibrose²⁹⁻³¹.

Atualmente, sabe-se que as proteínas estruturais e não estruturais do VHC induzem a alteração no metabolismo dos lipídios e o acúmulo de gordura nos hepatócitos, ativando genes da proteína ligante do elemento regulador de esteróides-1 (SREBP-1). Além disso, o VHC ainda reduz a taxa de excreção hepática de lipídios, diminuindo a secreção e o catabolismo, por meio de disfunção mitocondrial da

inibição da proteína microsomal transportadora de triglicérides (*MTP*)³², assim como reduz a beta-oxidação, por inibir o receptor ativador do proliferador de peroxissoma alfa (*PPAR α*)³³ (Figura 1).

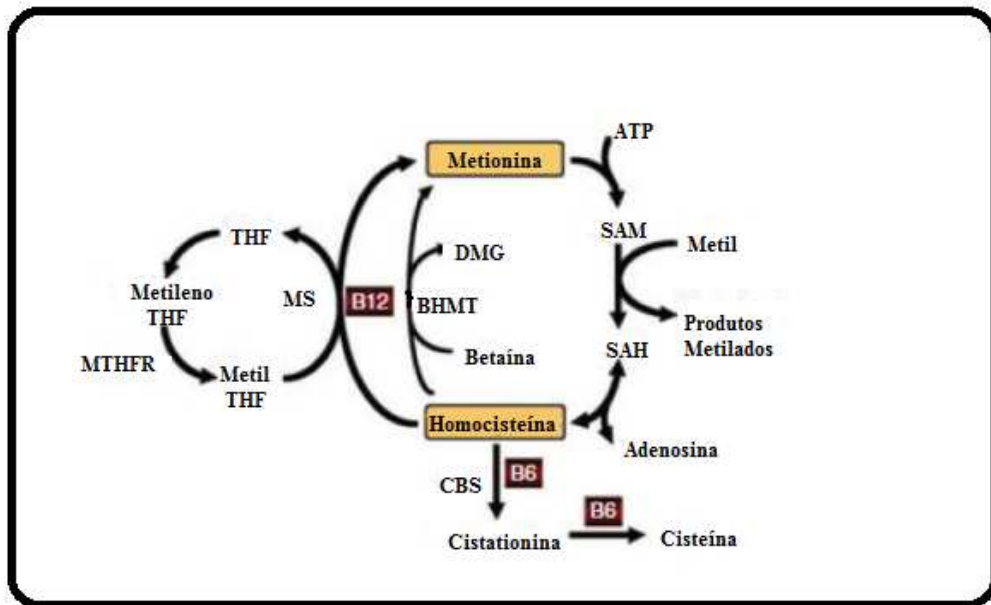
1.3 Hepatite C e metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*)

O polimorfismo do C677T (ALA222VAL) do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) está associado a elevadas concentrações de homocisteína (Hcy)³⁴. Uma mutação pontual com a substituição do aminoácido valina pelo aminoácido alanina (ALA222VAL) no nucleotídeo 677 do gene da *MTHFR* resulta em uma variante termolábil com a diminuição da atividade enzimática. Essa é uma herança autossômica recessiva e a frequência do polimorfismo do C677T do *MTHFR* varia entre os grupos raciais e étnicos, com 13% de TT homozigotos e 50% de CT entre os heterozigotos nas populações caucasianas e asiáticas, sendo muito baixa entre afro-americanos^{35,36}. Esse polimorfismo está comumente associado ao risco aumentado de doença arterial coronariana na população em Israel³⁷ e na América do Norte³⁸, assim como a casos de aterosclerose prematura e de doença trombótica³⁹. Também há relatos da associação da hiperhomocisteinemia (HHe) e do genótipo TT do gene da *MTHFR* com esteatose hepática avançada, fibrose e cirrose, levando à falha na resposta ao tratamento antiviral^{40,41}.

Sabe-se que indivíduos com hepatite C crônica, com estágios de fibrose avançada ou cirrose em estágio inicial, têm risco elevado de trombose em consequência da elevação do fator VIII, deficiência da proteína C e HHe⁴². Em pacientes submetidos a transplante hepático, foi observado que a HHe, associada a disfunção renal, tem risco cardiovascular aumentado pós-transplante, podendo ser uma importante causa de morbidade e mortalidade a longo prazo⁴³.

A Hcy é um aminoácido localizado na junção de duas vias metabólicas, uma que visa produzir cisteína (transulfuração) e outra que mantém constantes as concentrações de metionina (remetilação).

Na via da transulfuração, a metionina é convertida em Hcy, que se liga à serina para produzir a cistationina. Essa etapa é catalisada pela cistationina-beta-sintetase (*CBS*), na presença de vitamina B6 (piridoxina), que atua como um cofator. A cistationina é hidrolizada a cisteína pela gama-cistationase, com liberação de alfa-cetobutirato. A via da remetilação ocorre quando a Hcy recebe um grupo metilado pelo 5-metiltetrahydrofolato, reação catalisada pela 5-metiltetrahydrofolato homocisteína metil transferase (Metionina Sintase) que requer metilcobalamina, uma coenzima derivada da vitamina B12. O 5-metiltetrahydrofolato é formado a partir do 5,10-metilenotetrahydrofolato, reação catalisada pela enzima *MTHFR*. Alternativamente, o grupo metil pode ser doado pela betaína⁴⁴ (Figura 2).



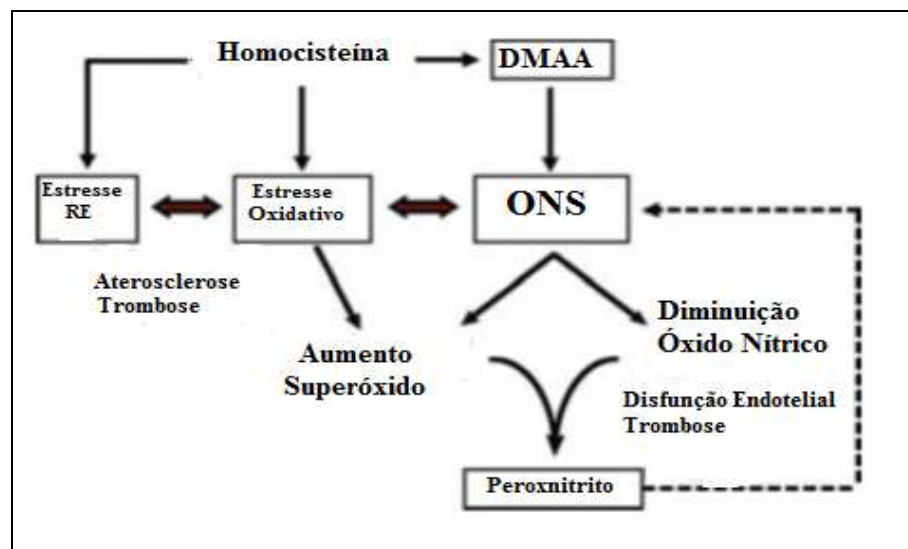
Fonte: Adaptado. Lentz.⁴⁴, p.1647.

Figura 2 – Junção de duas vias metabólicas, a transulfuração da cisteína e a remetilação da metionina, no metabolismo da homocisteína

Sabe-se que a HHe pode resultar tanto de alterações genéticas nas enzimas envolvidas no seu metabolismo⁴⁵⁻⁵⁰ quanto pelas deficiências de seus cofatores^{51,52}. A importância das vitaminas como determinantes da concentração plasmática da Hcy tem sido documentada em estudos epidemiológicos, e é sabido que a suplementação vitamínica reduz a concentração Hcy na maioria dos indivíduos que apresentam Hhe, independentemente da causa^{53,54}.

Já é bem estabelecido que a Hcy é um potente indutor da disfunção endotelial, particularmente nos pequenos vasos cerebrais e nas arteríolas mesentéricas. A disfunção endotelial, a aterosclerose e a trombose ocorrem quando a Hcy induz um estresse no retículo endoplasmático (RE) e nas vias de estresse oxidativo, levando à inflamação e à apoptose de células vasculares⁴⁴.

O estresse oxidativo, por sua vez, contribui para a disfunção endotelial e a trombose por meio da produção de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido. Associado a isso, a Hcy aumenta os níveis de dimetilarginina (DMAA), que é um inibidor da síntese de óxido nítrico (ON), por agir na óxido nítrico sintase (ONS), contribuindo diretamente para o aumento do estresse oxidativo por meio da produção de superóxido. A concentração elevada de DMAA está associada a um elevado risco cardiovascular em indivíduos com HHe, DM e hipertensão arterial⁵⁵. A reação oxidativa do superóxido com o ON gera peroxinitrito que, por sua vez, diminui a biodisponibilidade de ON, levando à disfunção endotelial (Figura 3).



Fonte: Adaptado. Lentz.⁴⁴, p.1651.

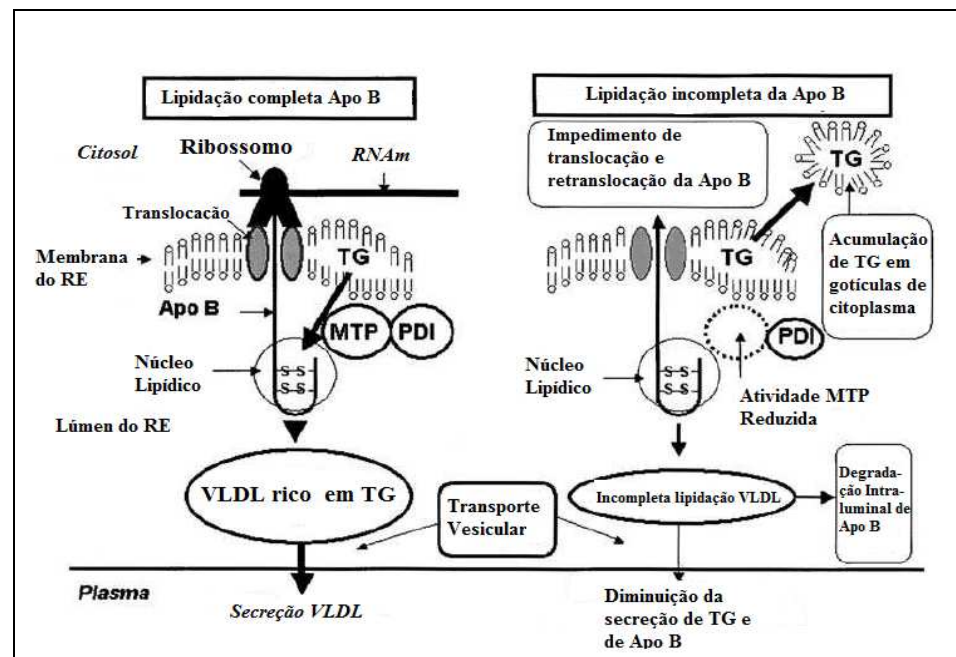
Figura 3 – Mecanismos de disfunção endotelial, aterosclerose e trombose associados à hiperhomocisteinemia

Por outro lado, estudos têm relacionado que a HHe seria outro fator que alteraria o metabolismo intracelular dos lipídios por aumentar a expressão de alguns genes, como da SREBP-1⁵⁶ relacionados a enzimas do metabolismo do colesterol e dos triglicerídeos^{57,58}. Em camundongos com HHe observou-se um aumento significativo na concentração de colesterol e de triglicerídeos nos hepatócitos. Esses

resultados indicam que a Hcy induz um estresse no RE, levando à ativação de genes responsáveis pela lipogênese, que provavelmente contribuem para a esteatose hepática com HHe⁵⁹.

1.4 Hepatite C e proteína microssomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*)

Experimentos em ratos transgênicos têm demonstrado que a proteína do core do VHC diminui a atividade de uma proteína de transporte intracelular de triglicerídeos, proteína microssomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*)⁶⁰. A *MTP* está presente no RE do intestino, do coração e principalmente no microssoma dos hepatócitos sob a forma de um heterodímero complexo com a proteína dissulfeto isomerase (PDI), que promove estabilidade à *MTP* e impede sua saída do microssoma⁶¹. É essencial a presença da *MTP* no processo de lipidação da Apo B, ou seja, o transporte intracelular dos triglicérides do retículo endoplasmático em direção ao plasma, incorporação à Apo B e exportação para o plasma sob a forma VLDL⁶² (Figura 4).



Fonte: Adaptado. Lettéron et al. ⁶², p.138.

Figura 4 – Transporte intracelular de triglicerídeos, incorporação da ApoB e exportação para o plasma sob a forma de VLDL, através da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*)

A variabilidade genética pode alterar a concentração da *MTP* no RE, o que tem um impacto sobre o padrão de secreção de lipoproteínas⁶³. Um polimorfismo funcional na região promotora do gene da *MTP* (-493G/T) confere ao alelo G uma menor atividade da proteína associada ao aumento da transcrição do alelo T *in vitro* e *in vivo*, favorecendo risco para elevação do colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e Apo B com aumento do risco cardiovascular em indivíduos saudáveis^{64,65}.

Além disso, há estudos relacionando o polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* com a suscetibilidade para o desenvolvimento EHNA em pacientes com diabetes tipo II⁶⁶. Outro estudo demonstrou que o alelo G está relacionado à redução da transcrição do gene da *MTP*, com redução da exportação dos triglicerídeos e consequentemente, maior acúmulo intracelular de ácido graxo nos hepatócitos de pacientes japoneses com EHNA⁶⁷. Por outro lado, nos pacientes com hepatite C

crônica do genótipo 3 com maior grau de esteatose, fibrose mais avançada e alta concentração do RNA viral, foi associada a presença do alelo T da *MTP*³².

Dados sobre a associação do polimorfismo de nucleotídeo único comum (SNP) da -493G/T *MTP* com as variáveis histológicas em pacientes com hepatite C crônica ainda são conflitantes. Inicialmente, Richardson et al.⁶⁸ analisaram o polimorfismo entre um conjunto de SNPs em oito genes previamente associados com fibrose hepática, em um grupo de 326 pacientes com hepatite crônica C, e identificaram a presença tanto do genótipo GG quanto do TT do gene *MTP* como fatores de risco independentes para a mais rápida progressão da fibrose hepática. Esse achado evidencia que estudos funcionais dos alelos G e T estão associados a diferentes atividades de transcrição do gene *MTP*.

Em virtude dos escassos conhecimentos sobre o papel de mutações genéticas relacionadas a genes que controlam parte do metabolismo lipídico no fígado, tais como o polimorfismo C677T (ALA222VAL) do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) da homocisteína e -493G/T do gene da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*) em pacientes com hepatite C crônica, idealizamos um estudo transversal que avaliasse a interferência desses polimorfismos em pacientes com hepatite crônica pelo vírus da hepatite C do Nordeste do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

Estimar a frequência do polimorfismo C677T (ALA222VAL) do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) da homocisteína e sua frequência segundo a classificação histológica e o tipo do genótipo do VHC em pacientes com hepatite C crônica do Nordeste do Brasil.

Estimar a frequência do polimorfismo -493G/T do gene da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*) e sua frequência segundo a classificação histológica e o tipo do genótipo do VHC em pacientes com hepatite C crônica do Nordeste do Brasil.

2.2 Objetivos secundários

Correlacionar a presença do polimorfismo C677T (ALA222VAL) do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) da homocisteína com características clínicas, bioquímicas, histológicas e do genótipo do VHC em pacientes com hepatite C crônica.

Correlacionar a presença do polimorfismo -493G/T do gene da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*) com características clínicas, bioquímicas, histológicas e do genótipo do VHC em pacientes com hepatite C crônica.

Correlacionar as características clínicas e bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica segundo a classificação histológica e o genótipo do VHC.

3 MÉTODO

3.1 Considerações éticas

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia e CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 0116/07) em 29/03/2007 e pelo Comitê de Pesquisa com Humanos do Hospital Univesitário Oswaldo Cruz (HUOC) da Universidade de Pernambuco (UPE).

3.2 População

Foram incluídos no estudo 174 pacientes com hepatite C crônica (91 homens e 83 mulheres), confirmada por identificação do RNA do vírus da hepatite C com biópsia hepática e nenhum tratamento antiviral prévio. Os pacientes que preenchem os critérios de inclusão foram selecionados de forma consecutiva no ambulatório de hepatologia do Instituto do Fígado de Pernambuco (IFP) entre o período de fevereiro de 2007 e outubro de 2009.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Portador de hepatite C crônica com idade de 15 a 75 anos, de ambos os sexos;

- Biópsia hepática compatível com hepatite crônica pelo VHC, tendo sido excluídas outras causas de hepatopatia crônica;
- Ausência de *diabetes mellitus* ou intolerância à glicose;
- Sem tratamento prévio para hepatite C;
- Consentimento informado.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Outras causas de hepatopatia crônica, como esquistossomose, outras hepatites virais, hepatite autoimune, Doença de Wilson, deficiência de alfa 1-antitripsina, hemocromatose e ingestão de álcool (<100g etanol/semana);
- Uso de alguns medicamentos hepatotóxicos nos últimos seis meses que são causa de esteatose hepática, tais como corticoides, tamoxifeno, metotrexato, amiodarona e agentes antiepiléticos;
- Uso de folato e vitamina B12 nos últimos seis meses;
- Doenças hepáticas descompensadas;
- Presença de neoplasias;
- Exposição ocupacional a agentes oxidantes-polifenóis e derivados de petróleo;
- Gravidez e lactação;
- Recusa em colaborar com a pesquisa.

3.3 Delineamento experimental

Pacientes com biópsia hepática com até dois anos do início do projeto foram incluídos no estudo, após a obtenção do Termo de Consentimento Pós-Esclarecido. Após serem arrolados no projeto, foram acompanhados no ambulatório de Hepatologia do IFP/HUOC/UPE, onde se realizou um questionário clínico e a coleta de sangue para estudo genético. Concomitantemente, foram solicitados os exames séricos, bem como a ultrassonografia do fígado, exames rotineiramente realizados na investigação dos pacientes com hepatite C, com ênfase na correta caracterização dos critérios de inclusão e exclusão.

Os pacientes foram divididos em grupos segundo classificação do genótipo do VHC e da histologia hepática. Os genótipos foram divididos em genótipo 1 e genótipo não 1 (incluindo os demais genótipos). A histologia hepática foi dividida baseada na presença do grau da fibrose segundo a classificação de METAVIR e na presença ou ausência da esteatose hepática. Cento e treze pacientes eram do genótipo 1 e 61 do genótipo não 1; 116 pacientes tinham fibrose grau 1 e grau 2 (fibrose 1+2) e 58 pacientes tinham fibrose grau 3 e grau 4 (fibrose 3+4); 104 pacientes tinham esteatose hepática, enquanto 70 pacientes não a apresentavam.

3.4 Avaliação clínica

No dia da realização da biópsia hepática foram obtidos os dados demográficos, como gênero e a presença de comorbidades, tais como *diabetes*

mellitus e dislipidemia, definidas segundo *Adult Treatment Panel III* (ATP III) (Hipertrigliceridemia: > 150 mg/dL; HDL colesterol: < 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres; Glicemia de jejum: > 110 mg/dL). Para avaliação de resistência insulínica foi usado o HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) (glicose de jejum [mg/dL] /18 x insulina de jejum [μ U/mL]/ 22,5). Foi utilizado como marcador de RI o índice HOMA, quando maior ou igual a 2,5^{69,70}.

3.5 Determinações bioquímicas

As características bioquímicas foram analisadas somente em 138 pacientes, segundo o genótipo do VHC e a classificação histológica.

Foram realizados os seguintes exames: hemograma completo, lipidograma, coagulograma, proteína total e frações, aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transpeptidase (GGT), bilirrubina total e frações, glicemia, insulina, marcadores para hepatite B e C, autoanticorpos hepáticos, cobre e ceruloplasmina sérica, perfil de ferro. Além disso, foram solicitados exame parasitológico de fezes e pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* (Kato-Katz), caso ainda não tivessem sido realizados.

Amostras de sangue coletadas após o jejum de 12 horas foram centrifugadas em até uma hora após a coleta para a separação de plasma, soro e células leucocitárias e armazenadas a -80°C. As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório central do HUOC. As concentrações de glicose foram determinadas pelo método enzimático da hexoquinase (Cobas, Roche, Suíça); a insulina, pelo método

de quimioluminescência (Cobas, Roche, Suíça); o folato e a vitamina B12, pelo método de eletroquimioluminescência (Cobas, Roche, Suíça); o colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos, pelo método colorimétrico enzimático (Cobas, Roche, Suíça), e o colesterol LDL, pela equação de Friedwald⁷¹. As concentrações de homocisteína foram determinadas pelo método de quimioluminescência (Cobas, Roche, Suíça)⁷² e foram considerados normais os valores de 12 (µmol/L) em homens e de 10 (µmol/L) em mulheres⁷³. O poder discriminativo da curva ROC para a concentração de homocisteína foi de 9 µmol/L.

3.6 Análise do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*)

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada no Laboratório de Hepatites Virais do HUOC/UPE, e os experimentos de biologia molecular relacionados às mutações no gene *MTHFR* foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia do HUOC/UPE.

3.6.1 Extração do DNA

O sangue total foi centrifugado a 2.500 rpm por 20 min; em seguida foi feita a remoção do plasma, e a camada de leucócitos foi removida para um microtubo de polipropileno livre de DNase e RNase, posteriormente congelado a -85°C.

A extração de DNA de células leucocitárias foi executada utilizando *kit GenomicPrep Blood DNA Isolation* (Amersham Biosciences Ltd., UK), segundo as recomendações do fabricante. No processo de extração, os leucócitos foram transferidos para um tubo de 15 mL de polipropileno e, em seguida, um tampão de lise foi adicionado, homogeneizando-se por 15 min à temperatura ambiente.

Após centrifugação, o sobrenadante foi decantado e, mais uma vez, adicionado o tampão de lise, com posterior agitação e incubação a 55°C por 30 min. Ao final da incubação, foram adicionados 0,2 mL de SDS 10% e 0,5 mL de precipitante proteico, seguindo-se agitação por 30 s, incubação por 15 min e centrifugação a 10.000 rpm por 2 min.

Depois da retirada do sobrenadante, foram adicionados 2 volumes de etanol até a observação do precipitado de DNA. O DNA foi quantificado em biofotômetro (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm.

3.6.2 Amplificação do DNA

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com um volume final de 25 µL. Foi realizada a preparação de um mix com a seguinte composição:

- tampão da enzima Taq polimerase 1x com 1,5 mM de MgCl₂ (*Invitrogen Life Technologies* – Carlsbad, CA, USA);
- 200 µM de cada dNTP (*Invitrogen Life Technologies* – Carlsbad, CA, USA), 5 pmol de cada primer:
Primer 1: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' (2,5 µL)
Primer 2: 5'- AGGCGGTGCGGTGAGAGTG' - 3' (2,5 µL);

- 13,5 µL de água MilliQ e 0,2 µL Taq polimerase 5U/ µL (*Invitrogen Life Technologies* – Carlsbad, CA , EUA);
- 100 ng de DNA genômico de cada paciente.

Um tubo branco com o mix (exceto o DNA genômico) foi preparado como controle negativo da reação. O protocolo da PCR em termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) consistiu de uma desnaturação inicial de 96°C por 10 min seguida de 35 ciclos de: 95°C por 60 s, 62°C por 90 s e 72°C por 60 s com uma extensão final de 72°C por 5 min. A amplificação foi verificada em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo no transiluminador UV (Ultralum, Hamburgo, Alemanha). Um produto de 198 pb foi obtido através da amplificação⁷⁴.

3.6.3 Genotipagem do gene C677T da *MTHFR*

O polimorfismo C677T *MTHFR* foi determinado pela técnica da reação de polimerase em cadeia – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR- RFLP), que consiste na utilização de enzimas de restrição que cortam o DNA em regiões específicas. No caso deste polimorfismo é criado um sítio de restrição, reconhecido pela enzima *Hinf* I. Foram digeridos com *Hinf* I (Pharmacia, Biotech, Inglaterra) 10 µL do produto da PCR por 12 h a 37°C. O material digerido pela *Hinf* I foi aplicado em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo e visualizado posteriormente em transiluminador UV (Ultralum, Hamburgo, Alemanha).

O produto que não sofreu digestão enzimática mantém os 198 pb mostrando a presença do genótipo CC (selvagem), enquanto o produto digerido apresenta dois

fragmentos, um com 175 pb e outro de 23 pb, revelando o genótipo TT; fragmentos de 198, 175 e 23 pb revelam o indivíduo heterozigoto CT (Figura 5).

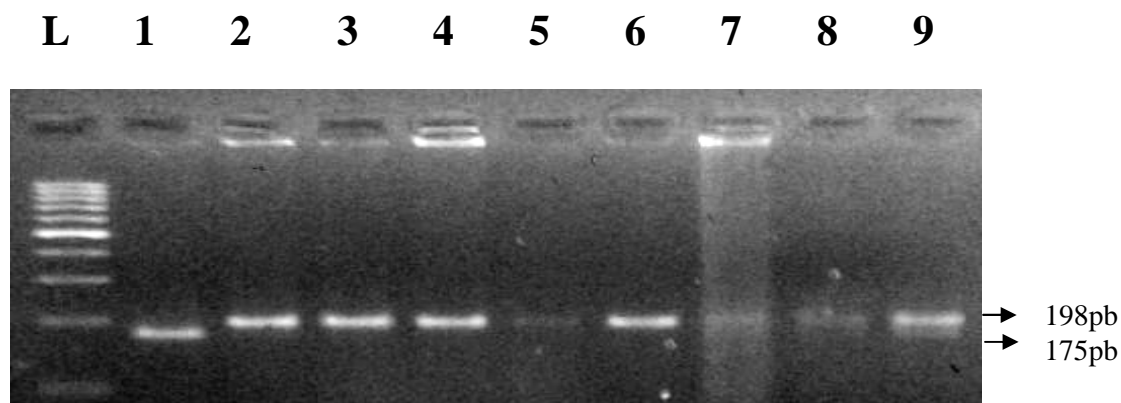


Figura 5. Eletroforese em Gel de agarose 3% mostrando o produto digerido pela enzima *Hinf* I. Observa-se na sequência (L) marcador de peso molecular 1Kb, genótipo TT (175pb e 23pb); 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Genótipo CC (198pb); 9. Genótipo CT (198, 175pb e 23pb)

3.7 Análise do polimorfismo -493G/T do gene da proteína microsomal transportadora de triglicéride (*MTP*)

Os experimentos de biologia molecular relacionados à MTP foram realizados no Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental (LIM/07) e no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.7.1 Genotipagem do gene -493G/T da *MTP*

Os produtos da PCR foram amplificados e sequenciados no equipamento ABI 3130 XL (Applied BioSystem, Foster City, EUA) de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit BigDye[®] Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied BioSystem, Foster City, EUA), conforme descrição a seguir: a reação foi realizada em volume final de 10 µL contendo 20 ng do produto da PCR, 2µL do *Kit big dye Terminator*, 2 µL do tampão da enzima e 2,0 pmol do *primer forward*. A reação foi realizada em termociclador MJ Research INC (Perkin Elmer Cetus), conforme o seguinte protocolo: 25 ciclos de desnaturação (96°C por 10 segundos, *annealing* (50°C por 5 s) e extensão (60°C por 4 min).

Os produtos foram purificados conforme descrito a seguir: a cada reação de sequenciamento foram adicionados 10 µL de água miliQ e 30 µL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e, após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 14.000 rpm. Em seguida, foram adicionados 100µL de etanol 70% às amostras que foram novamente centrifugadas à temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram secas e ressuspensas em 10 µL formamida deionizada e aplicadas no sequenciador automático. Foram visualizados eletroferogramas de cada um dos três possíveis genótipos homozigoto mutante (GG), heterozigoto (GT) e homozigoto normal (TT) (Figura 6).

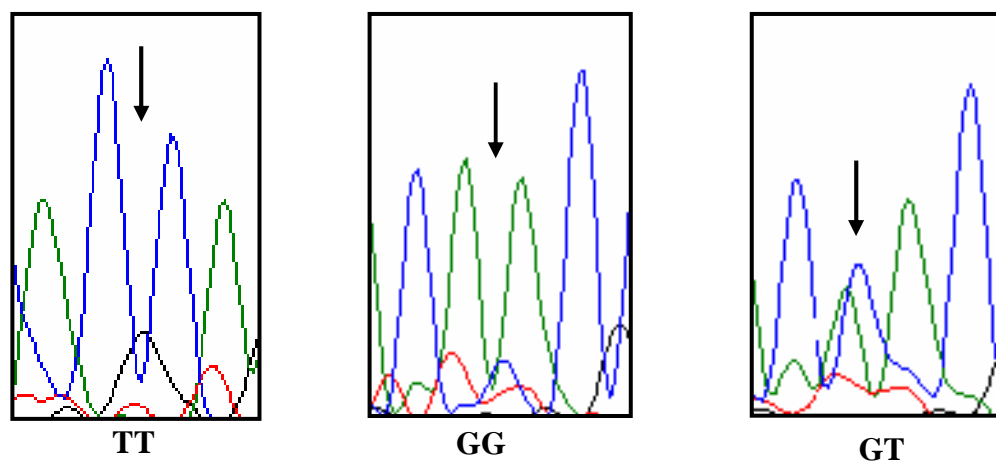


Figura 6- Eletroferogramas dos genótipos da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (*MTP*). Genótipo homozigoto mutante (GG), heterozigoto (GT) e homozigoto normal (TT)

3.8 Avaliação histológica

A biópsia hepática foi avaliada por um único observador, um hepatopatologista experiente do Instituto do Fígado de Pernambuco, que procedeu à avaliação do material sem prévia notificação dos dados clínico-laboratoriais dos pacientes. Fragmentos de tecido hepático foram fixados em formol salino a 4% e submetidos a colorações hematoxilina- eosina (HE), Tricrômio de Masson, Perls para pigmentos e impregnação com Sais de Prata (Reticulina).

Os estágios de fibrose e graus de inflamação foram classificados segundo o escore de METAVIR, que consiste em F0 (sem fibrose), F1 (fibrose portal sem septos), F2 (fibrose portal com alguns septos), F3 (numerosos septos sem cirrose), F4 (cirrose). A esteatose foi graduada de 0 a 3, baseada na porcentagem de gordura nos hepatócitos (1.esteatose leve < 33%; 2. moderada 33%-66% e 3. intensa > 66%)⁷⁵.

3.9 Análise estatística

As análises dos dados foram realizadas utilizando-se os *softwares* Excel 2007 e a versão 18.0 do PASW. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita por tabelas ou gráficos, incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, média, mediana e desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Kolmogorov-Sminorv. As amostras estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para análise das variáveis qualitativas foi aplicado o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher para testar associação entre elas. Para a análise das variáveis quantitativas foi aplicado o teste de Wilcoxon ou teste t-Student. Para a análise de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Foi aplicada a curva ROC para análise das concentrações de homocisteína, a fim de se obter o poder discriminativo e testar sua significância. Em todas as avaliações estatísticas, $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Frequência do C667T do gene da *MTHFR* em pacientes com hepatite C crônica

A frequência do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* foi analisada em 174 pacientes, incluindo o grupo controle e pacientes com VHC. Os grupos se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na Tabela 1 observa-se a frequência dos alelos (T e C) e dos genótipos (CC, CT e TT) nos pacientes com VHC e nos controles. A frequência do alelo T e do genótipo TT do gene da *MTHFR* nesse grupo de pacientes foi de 93/348 (26,7%) e 11/174 (6,3%), respectivamente, não havendo diferença significativa entre o grupo com VHC e o grupo controle ($p > 0,05$).

Por outro lado, a frequência do Genótipo TT do gene da *MTHFR* segundo a classificação histológica e o tipo do genótipo do VHC foi maior nos pacientes do genótipo não 1 ($p = 0,01$) (Tabela 2).

Tabela 1. Distribuição da frequência dos genótipos e do alelo do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* dos pacientes com hepatite C crônica e dos controles

Genótipo/ Alelo <i>MTHFR</i>	VHC (n=174)		Controles (n=59)		p
	N	(%)	N	(%)	
CC	92	52,9	29	49,1	^a 0,78
CT	71	40,8	27	45,8	
TT	11	6,3	03	5,0	
Alelo 677T	93	26,7	33	27,9	^b 0,81
Alelo677C	255	73,3	85	72,0	

^aQui-Quadrado

^bTeste Exato de Fisher

Tabela 2. Frequência do Alelo e do Genótipo do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* dos pacientes com hepatite C crônica segundo a classificação histológica e o genótipo do VHC

MTHFR	Frequência do Alelo (%)			
	TT	CT	CC	p*
Esteatose (n=104)	5,7	40,4	53,8	0,80
Sem Esteatose (n=70)	7,1	41,4	51,4	
Fibrose 1+2 (n=116)	5,1	37,9	56,9	0,21
Fibrose 3+4 (n=58)	8,6	46,5	44,8	
Genótipo 1 (n=113)	4,4	35,4	60,1	0,01
Genótipo Não 1 (n=61)	9,8	50,8	39,3	

*Qui-Quadrado

Os pacientes foram então divididos segundo a classificação do genótipo do VHC e subdivididos segundo o padrão histológico. Observou-se que o genótipo CT+TT do gene da *MTHFR* ocorreu em 48,7% dos pacientes do genótipo 1 do VHC com fibrose grau 1 e grau 2, porém nenhuma associação foi encontrada entre o gene da *MTHFR* e o tipo do genótipo do VHC independentemente do grau de fibrose hepática, e nem entre a presença ou ausência da esteatose hepática ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência do genótipo do polimorfismo C677T no gene da *MTHFR* dos pacientes com hepatite C crônica segundo classificação histológica e do genótipo do VHC

MTHFR	Genótipo 1		*p	Genótipo Não 1		*p
	Frequência do genótipo (%)			Frequência do genótipo (%)		
	CT+TT	CC		CT+TT	CC	
Fibrose 1+2	37(48,7%)	39(51,3%)	0,43	19 (47,5%)	21(52,5%)	0,79
Fibrose 3+4	15(40,5%)	22 (59,5%)		11(52,4%)	10(47,6%)	
Sem esteatose	23(48,9%)	24(51,1%)	0,70	08(34,8%)	15(65,2%)	0,11
Esteatose	29(43,9%)	37(56,1%)		22(57,9%)	16 (42,1%)	

*Qui-Quadrado

Quando analisou a presença da esteatose hepática em relação ao sexo, ao índice de HOMA, ao perfil lipídico e à presença do genótipo CT+TT do gene da *MTHFR*, não se observou associação entre essas variáveis nem em relação aos graus de fibrose hepática ($p > 0,05$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Análise de regressão logística entre esteatose hepática, sexo, HOMA, perfil lipídico e presença do gene *MTHFR* em pacientes portadores de hepatite C crônica

Variáveis	OR	IC 95%	p*
Sexo: F/M	1,1	0,6 – 2,0	0,88
HOMA $\geq 2,5$	1,5	0,7 - 3,2	0,35
LDL colesterol ≥ 130	0,5	0,2 - 1,6	0,35
HDL colesterol ≤ 40	1,1	0,5 - 2,4	0,84
Colesterol Total ≥ 200	0,8	0,2 - 2,9	0,75
Triglicerídeos ≥ 150	0,6	0,2 - 1,8	0,38
TT+CT (<i>MTHFR</i>)	0,8	0,4 - 1,5	0,64

*Teste exato de Fisher,

Referências: Triglicerídeos < 150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c < 130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, HOMA: Normal < 2,5.

Tabela 5. Análise de regressão logística entre fibrose 3+4, sexo, HOMA, perfil lipídico e presença do gene *MTHFR* em pacientes portadores de hepatite C crônica

Variáveis	OR	IC 95%	p*
Sexo: F/M	0,9	0,5 - 1,7	0,87
HOMA \geq 2,5	0,8	0,4 - 1,8	0,55
LDL colesterol \geq 130	2,1	0,4 - 10	0,51
HDL colesterol \leq 40	1,0	0,4 - 2,3	1,00
Colesterol Total \geq 200	1,7	0,3 - 8,3	0,73
Triglicerídeos \geq 150	1,4	0,4 - 5,3	0,76
TT+CT (<i>MTHFR</i>)	0,9	0,5 - 1,7	0,75

*Teste exato de Fisher.

Referências: Triglicerídeos <150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c <130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, HOMA: Normal < 2,5.

4.2 Frequência do -493G/T do gene da *MTP* em pacientes com hepatite C crônica

A frequência do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* foi analisada em 174 pacientes, incluindo o grupo controle e pacientes com VHC. Os grupos se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na Tabela 6 observa-se a frequência dos alelos (G e T) e dos genótipos (GG, GT e TT) nos pacientes com VHC e nos controles. A frequência do alelo G e do genótipo GG do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* nesse grupo de pacientes foi de 91/348 (32,0%) e 17/174 (9,8%), respectivamente, não havendo diferença significativa entre a presença de VHC ou não (controle).

Na Tabela 7 observa-se que não houve diferença entre a frequência do Genótipo GG do gene da *MTP* nos pacientes com VHC, segundo a classificação histológica e o tipo do genótipo do VHC.

Tabela 6. Distribuição da frequência dos genótipos e do alelo do polimorfismo -493G/T da *MTP* dos pacientes com hepatite C crônica e dos controles

Genótipo/ Alelo MTP	VHC (n = 174)		Controles (n = 89)		p
	N	(%)	N	(%)	
GG	17	9,8	08	8,9	^a 0,57
GT	57	32,8	35	39,3	
TT	100	57,5	46	51,7	
Alelo 493G	91	32,0	51	34,7	^b 0,60
Alelo 493 T	257	67,9	127	65,3	

^ap – Teste exato de Fisher^bp – Qui-Quadrado**Tabela 7.** Frequência do genótipo do polimorfismo -493G/T da *MTP* dos pacientes com hepatite C crônica segundo a classificação histológica e o genótipo do VHC

MTP	Frequência do Alelo (%)			
	GG	GT	TT	p*
Esteatose (n=104)	9,60	27,88	62,50	0,15
Sem Esteatose (n=70)	10,00	40,00	50,00	
Fibrose 1+2 (n=116)	8,62	33,62	57,75	0,65
Fibrose 3+4 (n=58)	12,06	31,03	56,89	
Genótipo 1 (n=113)	10,61	30,97	58,40	0,65
Genótipo Não 1 (n=61)	8,19	36,06	55,73	

*Qui-Quadrado

Posteriormente, os pacientes foram divididos segundo a classificação do genótipo do VHC e subdivididos segundo o padrão histológico. O genótipo GG+GT ocorreu em 56,8% dos pacientes com genótipo 1 do VHC e com fibrose hepática grau 3 e grau 4 (p = 0,02) em relação aos pacientes com genótipo 1 do VHC e com

grau de fibrose hepática 1+2. Não foi observada associação entre os graus de fibrose hepática no genótipo não 1 do VHC e nem entre pacientes com ou sem esteatose hepática independentemente do genótipo do VHC ($p>0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência do genótipo do polimorfismo -493G/T da *MTP* dos pacientes com hepatite C crônica segundo classificação histológica e do genótipo do VHC

MTP	Genótipo 1 Frequência do Genótipo (%)		p*	Genótipo Não 1 Frequência do Genótipo (%)		p*
	TT	GG +GT		TT	GT +GG	
Fibrose 1+2	50 (65,7%)	26 (34,3%)	0,02	20(50%)	20 (50%)	0,28
Fibrose 3+4	16 (43,2%)	21 (56,8%)		14 (66,6%)	7(33,4%)	
Sem Esteatose	29 (61,7%)	18 (38,3%)	0,57	15 (65,2%)	8 (34,8%)	0,29
Esteatose	37 (56%)	29(44%)		19 (50%)	19 (50%)	

*Teste exato de Fisher

Quando se analisou a regressão logística entre a presença da esteatose hepática em relação ao sexo, ao índice de HOMA, ao perfil lipídico e à presença do genótipo GG+GT do gene da *MTP* observou-se uma associação de proteção com a presença da esteatose hepática ($p = 0,01$) (Tabela 9). Porém, nenhuma associação foi observada em relação aos graus de fibrose hepática (Tabela 10).

Tabela 9. Análise de regressão logística entre esteatose hepática, sexo, HOMA, perfil lipídico e a presença do gene *MTP* em pacientes portadores de hepatite C crônica

Variáveis	OR	IC 95%	p*
Sexo: F/M	1,1	0,6 – 2,0	0,88
HOMA \geq 2,5	1,5	0,7 - 3,2	0,35
LDL colesterol \geq 130	0,5	0,2 - 1,6	0,35
HDL colesterol \leq 40	1,1	0,5 - 2,4	0,84
Colesterol Total \geq 200	0,8	0,2 - 2,9	0,75
Triglicerídeos \geq 150	0,6	0,2 - 1,8	0,38
GG+GT (<i>MTP</i>)	0,4	0,2 – 0,8	0,01

*Teste exato de Fisher.

Referências: Triglicerídeos < 150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c < 130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, HOMA: Normal < 2,5.

Tabela 10. Análise de regressão logística entre fibrose 3+4, sexo, HOMA, perfil lipídico e a presença do gene *MTP* em pacientes portadores de hepatite C crônica

Variáveis	OR	IC 95%	p*
Sexo: F/M	0,9	0,5 - 1,7	0,87
HOMA \geq 2,5	0,8	0,4 - 1,8	0,55
LDL colesterol \geq 130	2,1	0,4 - 10	0,51
HDL colesterol \leq 40	1,0	0,4 - 2,3	1,00
Colesterol Total \geq 200	1,7	0,3 - 8,3	0,73
Triglicerídeos \geq 150	1,4	0,4 - 5,3	0,76
GG+GT (<i>MTP</i>)	1,4	0,7 - 2,6	0,33

*Teste exato de Fisher.

Referências: Triglicerídeos < 150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c < 130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, HOMA: Normal < 2,5.

4.3 Dados clínicos e laboratoriais

Para a análise das variáveis bioquímicas, os pacientes foram agrupados segundo a classificação do genótipo do VHC, os graus de fibrose hepática e a presença ou ausência da esteatose hepática.

Observou-se que a concentração sérica do colesterol total no genótipo 1 do VHC foi maior em relação ao genótipo não 1 do VHC ($p = 0,01$). A concentração de triglicerídeos também foi maior no genótipo 1 do VHC em relação ao genótipo não 1, apesar de não haver diferença significativa entre eles ($p = 0,05$). As demais variáveis, como glicose, índice de HOMA, AST, ALT, γ GT, FA, HDL colesterol e LDL colesterol, não foram estatisticamente significantes em relação aos genótipos nesse grupo de pacientes com VHC ($p > 0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11: Característica clínica e bioquímica dos pacientes com hepatite C crônica segundo classificação do genótipo do VHC

	Genótipo 1 (n=93)	Genótipo Não 1 (n=45)	p*
Idade (anos)	54,06	51,59	0,14
Glicemia Jejum (mg/dL)	92,58	100,13	0,80
HOMA	2,72	3,35	0,74
AST (U/L)	68,69	73,24	0,97
ALT(U/L)	84,02	91,56	0,58
γGT (U/L)	86,06	84,31	0,93
FA (U/L)	83,03	72,67	0,26
Colesterol Total (mg/dL)	158,01	138,58	0,01
HDL colesterol (mg/dL)	49,05	46,73	0,29
LDL colesterol (mg/dL)	88,00	74,44	0,10
Triglicerídeos (mg/dL)	105,89	91,69	0,05

* Qui-Quadrado

Referências: Triglicerídeos <150mg/dL, Colesterol Total <200mg/dL, LDL-c <130mg/dL, HDL-c >40mg/dL, HOMA: Normal <2,5. AST (Normal- M: 10-34 F: 10-30 U/L) ALT (Normal – M: 10-44 F: 10-36U/L); γ GT (Normal-M:11-50 F:7-32 U/L); FA (Normal- M: 10-129 F: 35-104 UI) Glicemia <110mg/dL

Por outro lado, nos pacientes com hepatite C crônica com fibrose hepática grau 3 e grau 4 foi observada uma diferença significativa na concentração de AST, ALT e γ GT ($p < 0,05$), assim como uma significativa frequência do genótipo CT+TT

do gene da *MTHFR* nos pacientes com fibrose grau 1+2 ($p = 0,001$) (Tabela 12). Já nos pacientes com esteatose hepática, foi observada uma diferença significativa na concentração nas concentrações séricas de colesterol total e LDL colesterol ($p < 0,05$), e uma significativa frequência do genótipo CT+TT do gene da *MTHFR* ($p = 0,04$) (Tabela 13).

Tabela 12: Característica clínica e bioquímica dos pacientes com hepatite C crônica com fibrose hepática segundo a classificação de Metavir

	Fibrose 1+2 (n=101)	Fibrose 3+4 (n=37)	p*
Idade (anos)	52,26	55,07	0,10
Glicemia Jejum (mg/dL)	92,81	101,14	0,12
HOMA	2,73	3,47	0,10
AST (U/L)	63,96	87,14	0,01
ALT(U/L)	79,44	105,70	0,01
γGT (U/L)	72,51	120,92	0,02
FA (U/L)	73,20	97,27	0,08
Colesterol Total (mg/dL)	152,63	149,05	0,25
HDL colesterol (mg/dL)	47,55	50,32	0,52
LDL colesterol (mg/dL)	85,01	79,65	0,15
Triglicerídeos (mg/dL)	101,32	101,11	0,55
Frequência CT+TT (<i>MTHFR</i>)	68,3% (n=116)	31,7% (n=58)	0,001
Frequência GG +GT (<i>MTP</i>)	39,7% (n=116)	48,3% (n=58)	0,05

*Qui-Quadrado

Referências: Triglicerídeos <150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c <130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, HOMA: Normal < 2,5. AST (Normal- M: 10-34 F: 10-30 U/L) ALT (Normal – M: 10-44 F: 10- 36U/L); γ GT (Normal-M:11-50 F:7-32 U/L); FA (Normal- M: 10-129 F: 35-104 UI) Glicemia <110mg/dL

Tabela 13: Característica clínica e bioquímica dos pacientes com hepatite C crônica com ou sem esteatose hepática

	Sem Esteatose (n=45)	Esteatose (n=93)	p*
Idade (anos)	52,04	53,97	0,53
Glicemia Jejum (mg/dL)	93,24	95,91	0,30
HOMA	2,84	2,97	0,55
AST (U/L)	65,38	72,49	0,24
ALT(U/L)	79,44	89,88	0,54
γGT (U/L)	81,16	87,59	0,71
FA (U/L)	80,71	79,14	0,42
Colesterol Total (mg/dL)	162,91	146,24	0,02
HDL colesterol (mg/dL)	50,16	47,40	0,32
LDL colesterol (mg/dL)	94,18	78,45	0,03
Triglicerídeos (mg/dL)	95,09	104,25	0,50
Frequência CT+TT (<i>MTHFR</i>)	37,8% (n=70)	62,8% (n=104)	0,04
Frequência GG +GT (<i>MTP</i>)	50,0% (n=70)	37,5% (n=104)	0,12

*Qui-Quadrado

Referências: Triglicerídeos < 150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c < 130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, HOMA: Normal < 2,5. AST (Normal- M: 10-34 F: 10-30 U/L) ALT (Normal – M: 10-44 F: 10- 36U/L); γGT (Normal-M:11-50 F:7-32 U/L); FA (Normal- M: 10-129 F: 35-104 UI) Glicemia < 110mg/dL

Quando se analisaram 145 pacientes para a concentração de Hcy, nenhuma associação foi encontrada entre os graus de fibrose hepática e o tipo do genótipo do VHC ($p > 0,05$). Por outro lado, foi observada uma diferença significativa na concentração plasmática de Hcy nos pacientes com esteatose hepática ($p = 0,03$) (Tabela 14).

Tabela 14: Concentrações plasmáticas de homocisteína em pacientes com hepatite C crônica segundo classificação histológica e do genótipo do VHC

	<i>Homocisteína Média ± DP</i>	p*
Fibrose 1+2 (n=105)	9,7 ± 4,7	
Fibrose 3+4 (n=40)	10,4 ± 2,9	0,30
Sem Esteatose (n=46)	9,0 ± 2,8	
Esteatose (n=99)	10,3 ± 4,8	0,03
Genótipo 1 (n=96)	10,1 ± 2,9	
Genótipo Não -1 (n=49)	9,5 ± 6,1	0,55

*Teste t de Student.

Referência: Homocisteína = 9,0 µmol/L

Ao se analisarem as características bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica em relação ao polimorfismo C677T da *MTHFR*, observou-se que a concentração de Vit. B12 foi maior nos pacientes com o genótipo CT+TT do gene *MTHFR*, apesar de não haver diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Características clínicas e bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica em relação ao polimorfismo 677C/T da *MTHFR*

Variáveis	CT+TT Média ± DP (n=65)	CC Média ± DP (n=73)	p*
Colesterol Total	147,3 ± 33,7	155,6 ± 43,8	0,21
HDL-c	47,5 ± 14,4	49,0 ± 13,9	0,55
LDLc	79,7 ± 30,4	87,0 ± 39,8	0,23
Triglicerídeos	103,4 ± 40,6	99,4 ± 45,9	0,59
Glicose	97,4 ± 37,5	93,0 ± 18,1	0,39
Folato	12,9 ± 2,8	12,4 ± 2,8	0,33
Vit.B12	766,7 ± 361,8	652,8 ± 278,3	0,09
HOMA	3,2 ± 2,9	2,7 ± 1,8	0,21

*Teste t de Student.

Referências: Triglicerídeos < 150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c < 130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, Glicemia < 110mg/dL, Folato 3,1-17,5 ng/mL, Vit. B12 197-866 pg/mL, HOMA: Normal < 2,5.

Por outro lado, ao se analisarem as características bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica em relação ao polimorfismo -493G/T da *MTP* observou-se que a concentração de colesterol total foi maior nos pacientes com o genótipo GT+GG do gene *MTP* em relação ao genótipo TT, apesar de não haver diferença significativa entre eles ($p = 0,08$) (Tabela 16).

Tabela 16: Características bioquímicas dos pacientes com hepatite C crônica em relação ao polimorfismo -493G/T da *MTP*

Variáveis	GG+GT	TT	p
	Média ± DP (n=56)	Média ± DP (n=82)	
Colesterol Total	159,9 ±44,7	145,8 ± 34,3	0,08
HDL-c	50,2 ±14,8	47,0 ± 13,6	0,15
LDL-c	90,0 ±40,7	79,0±31,3	0,15
Triglicerídeo	99,1 ± 31,5	102,8 ± 50,2	0,56
Glicose	98,3 ± 39,9	92,7 ± 17,3	0,69
HOMA	2,9 ±2,9	2,9± 1,9	0,32

Teste t de Student.

Referências: Triglicerídeos <150mg/dL, Colesterol Total < 200mg/dL, LDL-c <130mg/dL, HDL-c > 40mg/dL, Glicemia <110mg/dL, HOMA: Normal < 2,5.

5 DISCUSSÃO

A presente tese teve como interesse estudar a frequência do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e -493G/T do gene *MTP* em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C na cidade do Recife e avaliar se havia alguma associação entre os polimorfismos com a presença de esteatose hepática, fibrose hepática mais grave e diferença entre os genótipos do VHC.

A infecção crônica pelo VHC é responsável por cerca de 250 a 350 mil mortes por ano, em todo o mundo, relacionadas com descompensação da cirrose hepática, doença hepática em fase terminal e carcinoma hepatocelular. Nos Estados Unidos, a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C foi de 1,6% entre os anos 1999 e 2002, equivalendo a cerca de 4,1 milhões de pessoas positivas para o anticorpo contra o vírus da hepatite C (Anti-HCV)⁷⁶.

No Brasil, segundo dados preliminares do inquérito nacional de base populacional nas capitais brasileiras, a prevalência global para o anti-HCV referente ao conjunto das capitais federais foi de 1,38% (IC95% 1,12% - 1,64%). O percentual de expostos ao VHC na faixa etária de 10 a 19 anos foi de 0,75% (IC% 0,53% - 0,98%) e de 20 a 69 anos foi de 1,56% (IC 95% 1,28% - 1,91%). Nas diferentes regiões do país, a soroprevalência do anti-HCV foi semelhante, atingindo valores de até 1% na faixa etária de 10 a 19 anos, e de até 2% na faixa etária de 20 a 69 anos, exceção feita à Região Norte, onde, nessa última faixa etária, esses valores foram um pouco mais elevados*.

Atualmente a população da cidade do Recife é de aproximadamente um milhão e meio de pessoas, e é a cidade com maior densidade populacional do Nordeste brasileiro, a terceira mais densamente habitada do país⁷⁷. Porém, devido à

*Brasil. Ministério da Saúde. Inquérito nacional de hepatites virais.

subnotificação dos casos de hepatite C crônica nessa cidade, não se sabe a real prevalência desse anticorpo no município.

A heterogeneidade da população brasileira quanto à definição racial foi um dos pontos mais árduos na interpretação dos resultados, podendo representar um fator de indefinição neste estudo, uma vez que na cidade do Recife houve uma miscigenação entre a população portuguesa, holandesa, negra e indígena.

O polimorfismo C677T do gene da *MTHFR* não mostrou diferença na distribuição do alelo T e do alelo C nesta amostra de pacientes com hepatite C crônica da cidade do Recife, porém o genótipo TT do gene da *MTHFR* foi mais frequente nos pacientes com o genótipo não 1 do VHC, independentemente do padrão histológico. Também foi observada uma maior frequência do genótipo CT+TT do gene da *MTHFR* nos pacientes com fibrose grau 1+2 e naqueles com esteatose hepática. Além disso, a concentração de Hcy foi maior nos pacientes com esteatose hepática.

Toniutto et al.⁷⁸ acompanharam, por um período de um ano, 63 pacientes submetidos a transplante hepático por hepatite C recorrente, e observaram que, naqueles que apresentavam o genótipo TT do gene da *MTHFR* havia mais fibrose hepática, concentrações elevadas de Hcy e triglicerídeos, mas sem esteatose hepática no enxerto. Fabris et al.⁷⁹, numa coorte de 212 pacientes submetidos a transplante hepático de diversas etiologias, após uma análise de regressão logística, em 63 pacientes transplantados por hepatocarcinoma (HCC), observaram uma associação do genótipo TT do gene da *MTHFR*, do sexo masculino, da doença hepática alcoólica e da idade superior a 55 anos como fatores preditores independentes para

HCC. Fei Jin et al.⁸⁰, numa metanálise, também observaram o aumento do risco para HCC em indivíduos com doença hepática e o genótipo TT do gene da *MTHFR*.

Por outro lado, Borgia et al.⁸¹ avaliaram 112 pacientes com hepatite crônica C tratados com interferon peguilado e ribavirina e, naqueles pacientes que apresentaram a concentração elevada de Hcy, a presença do genótipo TT do gene da *MTHFR* não previu resposta ao tratamento e nem esteve associada com esteatose hepática.

Em um estudo prospectivo conduzido por Adinolfi et al.⁷³, no qual eles avaliaram 116 pacientes com VHC o desenvolvimento da esteatose hepática e a progressão da hepatite C crônica após uma análise multivariada, os autores observaram que a esteatose hepática foi independentemente associada com a HHe (OR 7,1), a fibrose hepática (OR 4,0) e o genótipo não 1 do VHC (OR 4,6). Para esses autores, a presença do genótipo TT do gene da *MTHFR* associada à HHe parece desempenhar um papel no desenvolvimento de maior grau de esteatose hepática, que, por sua vez, acelera a progressão da fibrose hepática na hepatite C crônica.

Werstuck et al.⁵⁹, em um estudo com cultura de células endoteliais humanas da veia umbilical, evidenciaram que o desenvolvimento e a progressão da esteatose hepática parece ser consequência do constante estresse no RE induzido pela HHe através da ativação de genes SREBP-1, levando ao aumento da biossíntese e da absorção de lipídios.

Silva et al.⁸², num estudo de caso controle com 44 pacientes idosos na cidade do Recife, observaram a associação entre o aumento da concentração plasmática de Hcy e doença de Alzheimer, não sendo encontrada relação do polimorfismo C677T

do gene da *MTHFR* com a susceptibilidade genética para a doença de Alzheimer nessa amostra.

Os dados acima poderiam explicar a presença da concentração elevada de Hcy em pacientes com esteatose hepática em nossa amostra, corroborando o achado do genótipo TT da *MTHFR* em pacientes do genótipo não 1 do VHC, uma vez que a esteatose hepática presente no genótipo não 1 do VHC se deve à presença de sequências específicas do genoma desse genótipo, que estão envolvidas no acúmulo intracelular de gordura nos hepatócitos.

Assim, o fato de termos achado uma maior frequência do polimorfismo C677T do gene da *MTHFR* nessa amostra de pacientes com hepatite C crônica com fibrose grau 1+2 e naqueles com esteatose hepática está de acordo com os autores citados acima, assim como sobre a concentração de Hcy maior nos pacientes com esteatose hepática apesar de a concentração de vit. B12 e de folato serem normais.

No que se refere ao polimorfismo -493G/T do gene da *MTP*, não houve diferença na distribuição do alelo G e do alelo T nesta amostra de pacientes com hepatite C crônica da cidade do Recife. Não foi observada diferença na frequência do genótipo GG + GT do gene da *MTP* independentemente do padrão histológico. A associação do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* com esteatose hepática parece diferir entre DHGNA e hepatite C.

Nossos dados identificaram a presença do alelo G, mais frequentemente presente em pacientes com genótipo 1 do VHC e com fibrose grau 3 e grau 4, apesar de não ter havido uma associação direta entre a presença desse alelo com os graus de fibrose hepática. Além disso, os genótipos GG + GT foram encontrados como fatores

independentes de proteção contra a esteatose hepática nessa amostra de pacientes com hepatite C crônica, independentemente do genótipo do VHC.

Embora o alelo T esteja associado a uma maior atividade transcricional da *MTP*, protegendo contra o desenvolvimento da DGHNA, por aumentar a exportação de triglicerídeos dos hepatócitos^{83,84}, também tem sido associado à esteatose hepática em pacientes com o genótipo 3 do VHC, provavelmente, por promover a produção de mais de VLDL ricas em lipídios, facilitando a maturação dos precursores do VHC por meio da otimização da replicação do vírus e, assim, contribuindo para aumentar o grau de esteatose hepática.

Petit et al.⁸⁵, em uma pequena série de 86 pacientes com VHC, entre os quais 39 apresentavam esteatose hepática, não encontraram associação entre o SNP -493 G/T *MTP* e a presença da esteatose hepática, enquanto Zampino et al.³², analisando 102 pacientes com genótipo não 1 do VHC, mostraram maior grau de esteatose hepática, maior concentração do RNA viral e fibrose avançada em pacientes portadores do alelo T. Mirandola et al.⁸⁶ avaliaram uma coorte de 298 pacientes com hepatite C e encontraram idade, índice de massa corporal (IMC), genótipo não 1 do VHC e a presença do alelo T *MTP* como fatores de risco independentes para altos graus de esteatose hepática. Desse modo, o fato de nossa pesquisa ter notado associação entre os genótipos GG + GT como fatores independentes de proteção contra esteatose nos leva a pensar na mesma direção que os resultados publicados por esses dois grupos de pesquisadores, com a diferença de que, no presente estudo, a associação entre o SNP e a esteatose hepática foi independentemente do genótipo do VHC. Como sugere Perlemuter et al.⁶⁰, essa diminuição da atividade e da transcrição do gene da *MTP* poder ser explicada, em parte, pela interação da proteína do core do

VHC, que em camundongos transgênicos diminui a secreção hepática de Apo B e de triglicerídeos, interferindo na montagem e secreção de VLDL.

Também foi observado que as concentrações de colesterol total e LDL-c foram menores em pacientes com VHC e esteatose hepática. Resultados semelhantes foram descritos por Corey et al.⁸⁷, numa coorte 179 pacientes com hepatite C crônica, quando foram comparadas as concentrações séricas de colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicerídeos com 180 controles pareados por idade. Observou-se que pacientes com VHC tinham concentrações de colesterol total e LDL-c menores do que no grupo controle, não havendo diferença entre a concentração sérica de HDL-c e de triglicerídeos em ambos os grupos. Esses dados corroboram a hipótese de que as lipovirpartículas usam os receptores LDL-c dos hepatócitos como pontos de entrada do vírus. Uma vez dentro dos hepatócitos, sua replicação é dependente do ambiente lipídico do hospedeiro⁸⁸⁻⁹⁰.

No presente estudo também foi observado que a concentração sérica do colesterol total no genótipo não 1 do VHC foi menor em relação ao genótipo 1 do VHC, apesar de a concentração de triglicerídeos também ter sido menor nesse grupo, porém sem diferença significativa entre eles. Vários autores ratificam que a esteatose hepática é mais frequente e grave em pacientes com genótipo não 1 do VHC, sugerindo a interação do vírus com o metabolismo lipídico, observando regressão ou desaparecimento da esteatose hepática após tratamento antiviral com resposta virológica sustentada, principalmente no genótipo não 1 do VHC^{18,91,92,93}.

6 CONCLUSÕES

1. A frequência do genótipo TT do gene *MTHFR* foi de 9,8%, maior nos pacientes com hepatite C crônica da cidade do Recife do genótipo não 1 do VHC. Também foi observada uma maior frequência do genótipo CT+TT do gene da *MTHFR* nos pacientes com fibrose grau 1+2 e naqueles com esteatose hepática.
2. Não foi observada uma associação direta entre o perfil lipídico e o índice de HOMA com a classificação histológica e a presença do polimorfismo C677T do gene da *MTHFR*.
3. A concentração plasmática de homocisteína foi maior nos pacientes com hepatite C crônica com esteatose hepática.
4. A frequência do genótipo GG+GT do gene *MTP* foi de 56,8%, maior nos pacientes com hepatite C crônica da cidade do Recife do genótipo 1 do VHC com fibrose hepática grau 3 e grau 4, apesar de não ter sido observada diferença na frequência do genótipo GG +GT do gene da *MTP* independente do padrão histológico.
5. Foi observada uma associação direta entre a presença da esteatose hepática nos pacientes com hepatite C crônica com o genótipo GG+GT do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP* independentemente do genótipo do VHC.

6. Não foi observada uma associação direta entre o perfil lipídico e o índice de HOMA com a classificação histológica e a presença do polimorfismo -493G/T do gene da *MTP*.
7. A concentração sérica do colesterol total foi maior nos pacientes com hepatite C crônica do genótipo 1 do VHC.
8. As concentrações de AST, ALT, γ GT e fosfatase alcalina foram maiores nos pacientes com hepatite C crônica com fibrose hepática grau 3 e grau 4.
9. A concentração sérica de LDL-c e do colesterol total foram menores nos pacientes com hepatite C crônica com esteatose hepática.

7 ANEXOS

ANEXO 1 - FICHA CADASTRAL DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Nome: _____ RG-HC: _____

Data Nasc: _____ Sexo: () masc, () fem,

Endereço: _____

Telefone: _____

Data: _____

Motivo do encaminhamento:

() ANTI-HCV total _____ HCV RNA _____ GENÓTIPO _____

() Esteatose hepática por método de imagem (USG, TC, RNM)

() Alteração de enzimas hepáticas (TGO, TGP, FA, GGT)

() Achado de esteatose em biópsia hepática durante cirurgia abdominal

() outros: _____

Fatores de risco associados:() Obesidade (Obesidade: $IMC > 30 \text{Kg/m}^2$) ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$)

() DM tipo 2 diagnosticado em _____

() Hipercolesterolemia ($CT > 200 \text{mg/dL}$)() Hipertrigliceridemia ($TG > 150 \text{mg/dL}$)

() Síndrome plurimetabólica () DM ou IGT ou IR + 2 abaixo:

() HAS ($PA > 160 \times 90 \text{mmHg}$)() Obesidade ($IMC > 30$ ou $\text{cintura/quadril} > 0,85$ fem, $> 0,9$ masc)() Dislipidemia ($HDL < 40 \text{mg/dL}$ ou $TG > 150 \text{mg/dL}$)

() Antecedentes de nutrição parenteral, emagrecimento acentuado, desnutrição, “bypass” intestinal, síndrome do intestino curto,

() Hepatite alcoólica: Ingestão alcoólica semanal: (, , % x mL x 0,8 = , , , , , , gramas)

Medicações em uso (serão excluídos pacientes em uso de corticosteróides, amiodarona ou outra droga hepatotóxica) _____

História familiar de diabetes tipo 2:

() pai () mãe () irmãos () avós () tios

Anamnese / exame físico:

- () dor em HCD () síndrome dispéptica () astenia
- () sinais de insuf, hepática (spiders, ginecomastia, eritema palmar, icterícia)
- () sinais de hipertensão portal (esplenomegalia, circulação colateral abdominal)
- () familiares de primeiro e segundo grau com hepatopatia

USG ABDOMINAL (/ /):

BIÓPSIA HEPÁTICA (/ /):

EXAMES	DATA	DATA	DATA	DATA
TGO (máx nl:)				
TGP (máx nl:)				
FA (máx nl:)				
GGT (máx nl:)				
BT / BD				
Albumina				
TP (INR)				
Glicemia				
Hb A1c				
Insulina				
CT				
HDL				
LDL				
TG				
Ureia				
Creatinina				
Hb / VCM				

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

I**I - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO C677T (ALA222VAL) DO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (*MTHFR*) DA HOMOCISTEÍNA E -493G/T DO GENE DA PROTEÍNA MICROSSOMAL TRANSPORTADORA DE TRIGLICERÍDEOS (*MTP*) EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA DO NORDESTE DO BRASIL
2. PESQUISADOR: Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira
CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 75499,
UNIDADE DO HUOC/UPE: AMBULATÓRIO DE HEPATOLOGIA DO INSTITUTO DO FÍGADO DE PERNAMBUCO,
Pesquisador executante—Erika Rabelo Forte de Siqueira
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e objetivos da pesquisa,

Aproximadamente 200 milhões de pessoas são infectadas cronicamente pelo vírus da hepatite C (VHC) no mundo, A infecção crônica pelo vírus C pode desencadear cirrose hepática e câncer de fígado, tornando-se um problema de ordem mundial, Associadamente, estudos têm demonstrado que existe acúmulo de gordura do fígado (esteatose) em pacientes com infecção crônica pelo vírus C, Este acúmulo excessivo de gordura, por um período longo de tempo, pode ocasionar em alguns indivíduos, o desenvolvimento de complicações crônicas como inflamação no fígado consequente à gordura (esteatohepatite) e, doença crônica no fígado (cirrose por gordura), Alguns estudos têm demonstrado que alterações genéticas possam existir em pacientes com hepatite C e que acumulam gordura no fígado.

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar de uma pesquisa que tem por objetivo identificar fatores genéticos que determinem a probabilidade, Com essa comparação será possível identificar fatores de risco para o desenvolvimento de complicação nos portadores de hepatite C, com isso priorizar o tratamento adequado para estes pacientes, Este estudo será conduzido pela Dra, Érika Rabelo Forte de Siqueira no Hospital Universitário Oswaldo Cruz de Pernambuco, localizado na rua Arnóbio Marques 310 -Santo Amaro-Recife- PE- CEP:50100-130 Campus Universitário-tel 81-34230501, e Dra, Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, localizado na Av, Dr, Enéas de Carvalho Aguiar 255 - 9º andar-sala 9159- Cerqueira César- São Paulo-SP- CEP: 05403-900-tel 30696447.

Solicitamos que leia cuidadosamente este termo de consentimento e faça qualquer pergunta para esclarecer todas as dúvidas antes de concordar em participar deste estudo.

2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais** ,A pesquisa consistirá num estudo completo do seu fígado abrangendo perguntas gerais, perguntas relacionadas à hábitos alimentares, breve exame físico, colheita de sangue para exames laboratoriais, Também serão realizadas medidas denominadas antropométricas que consistem em peso, altura, circunferência de abdome.
3. **Desconfortos e riscos esperados:** A entrevista e o exame físico deverão ter uma duração média de 15-20 minutos, os desconfortos da colheita de sangue serão os mesmos de qualquer outro exame laboratorial, incluindo desconforto no local da punção, A avaliação nutricional com determinação de medidas antropométricas também não acarreta desconfortos.
4. **Benefícios que poderão ser obtidos:** A existência de problemas no fígado e exames de sangue que possam indicar probabilidade de evolução para formas mais severas de doença poderá ser identificado, e esta informação poderá trazer benefícios à sua pessoa sob a forma de orientação ambulatorial mais eficaz, Não há garantia dos benefícios que possam resultar da sua participação neste estudo, exceto a orientação dietética e nutricional que possam contribuir para sua perda de peso, Por outro lado, o conhecimento adquirido neste estudo poderá beneficiar outras pessoas.
5. **Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** O sr,(sra,) tem a alternativa de não participar dessa pesquisa caso não o deseje.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. As informações do questionário e de sua avaliação estarão à sua disposição sempre que desejar, e o sr,(sra,) tem toda liberdade de fazer perguntas caso tenha alguma dúvida;

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência, O sr,(sra,) poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem precisar se justificar, e continuando a gozar de todos os direitos como paciente;

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade, As informações aqui reunidas serão sigilosas e somente serão divulgadas para a equipe de saúde que cuida do seu caso, a fim de que seu atendimento seja o melhor possível, ou para estudos e publicações científicas, sendo que neste caso seu nome e sua identidade não serão conhecidos;

4. disponibilidade de assistência no ambulatório de Hepatologia do Instituto do Fígado de Pernambuco HUOC / UPE, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa,Os pacientes pertencem ao ambulatório serão seguidos durante e após a pesquisa, como já o eram antes;

5,viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa, O acesso ao projeto é de forma voluntária e não está prevista nenhuma indenização, O paciente expressa ainda sua concordância e vontade em se submeter aos exames referidos, assumindo a responsabilidade e risco pelos eventuais efeitos indesejáveis que venham ocorrer em decorrência do mesmo.

**V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS**

Dra. ERIKA RABELO FORTE DE SIQUEIRA FONE: (81) 3421 7000

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Recife, de 2007,

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

assinatura da testemunha

ANEXO 3 - APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA – CAPPesq



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.03.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0116/07**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE C677T DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) DA HEMOCISTEÍNA E DO GENE G493T DA PROTEÍNA MICROSSOMAL TRANSPORTADORA DE TRIGLICERÍDEOS (MTP) EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA"**, apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira**

Pesquisadores Executantes: **Érica Rabelo Forte de Siqueira, Maria Tereza Cartaxo Muniz, Leila M.M. Beltrão Pereira, José Tadeu Stéfano, Maria Lúcia Corrêa Gianella, Flair José Carrilho**

CAPPesq, 29 de março de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

ANEXO 4 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – CEP/HUOC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1o. andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE
Fone: (81) 2101.1530 - Fone/Fax: (81) 2101.1536


Reunião: 12/12/2006

Parecer/CEP/HUOC 148/2006

Projeto: *Avaliação do polimorfismo do gene C677T da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) da homocisteína e do gene G493T da proteína microsomal transportadora de triglicerídeos (MTP) em pacientes portadores de hepatite Crônica*

Pesquisador Principal: Érika Rabelo Forte de Siqueira

Resultado: APROVADO


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Prof. Wilson de Oliveira
Coordenador

8 REFERÊNCIAS

1. Immunization. Vaccines and biological. Available from:
http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_c/en/.
2. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:9599-604.
3. Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology*. 2006;348:1-12.
4. Lau DT, Fish PM, Sinha M, Owen DM, Lemon SM, Gale M, et al. Interferon regulatory factor-3 activation, hepatic interferon-stimulated gene expression, and immune cell infiltration in hepatitis C virus patients. *Hepatology*. 2008;47:799-809.
5. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis*. 2005;25:93-104.
6. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42:962-73..
7. Pereira LM, Spinelli V, Ximenes RA, Cavalcanti MS, Melo R, Jucá N, Mizokami M, McFarlane IG. Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. *J Med Virol*. 2002;67(1):27-32.
8. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(17):6547-9.
9. Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Cottone M, Rapicetta M, Marino L, et al. Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. A case-control study. *Ann Intern Med*. 1992;116(2):97-102.

10. Ren JM, Marshall BA, Mueckler MM, McCaleb M, Amatruda JM, Shulman GI. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest.* 1995;95(1):429-32.
11. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:2436-41.
12. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S21-9.
13. Mehta SH, Strathdee SA, Thomas DL. Association between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus. *Epidemiol Rev.* 2001;23(2):302-12.
14. Grimbirt S, Valensi P, Levy-Marchal C, Perret G, Richardet JP, Raffoux C, et al. High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. A case-control study. *Gastroenterol Clin Biol.* 1996;20(6-7):544-8.
15. Ozyilkan E, Erbas T, Simsek H, Telatar F, Kayhan B, Telatar H. Increased prevalence of hepatitis C virus antibodies in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med.* 1994;235(3):283-4.
16. Zaitoun A M, Al Mardini H, Awad S, Ukabam S, Makadisi S, Record C, et al. Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol.* 2001;54:461-5.
17. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology.* 2001;33(6):1358-64.
18. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Male PJ, Mentha G, et al. Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol.* 2000;33(1):106-15.
19. Serfaty L, Andreani T, Giral P, Carbonell N, Chazouilleres O, Poupon R. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001;34(3):428-34.

20. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):27-41.
21. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(4):1200-5.
22. Lai MM. Hepatitis C virus proteins: direct link to hepatic oxidative stress, steatosis, carcinogenesis and more. *Gastroenterology.* 2002;122(2):568-71.
23. Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, Tan MH. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care.* 2007;30(3):734-43.
24. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care.* 2006;29(5):1140-9.
25. Boddi M, Abbate R, Chellini B, Giusti B, Solazzo V, Soft F, et al. HCV infection facilitates asymptomatic carotid atherosclerosis: preliminary report of HCV RNA localization in human carotid plaques. *Dig Liver Dis.* 2007;39(Suppl 1):S55-60.
26. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Wheeler MD, Gabele E, et al. Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice. *J Immunol.* 2002;168(6):2963-9.
27. Kooby DA, Fong Y, Suriawinata A, Gonen M, Allen PJ, Klimstra DS, et al. Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J Gastrointest Surg.* 2003;7(8):1034-44
28. den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):644-9.
29. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology.* 2001;35(2):373-9.

30. Festa A, D'Agostino RB, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000;201:42-7.
31. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
32. Zampino R, Ingrosso D, Durante-Mangoni E, Capasso R, Tripodi MF, Restivo L, et al. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) -493G/T gene polymorphism contributes to fat liver accumulation in HCV genotype 3 infected patients. *J Viral Hepat*. 2008;15(10):740-6.
33. Syed EG, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid Metabolism. *Trends Endocrinol Metabol*. 2010;21(1):33-40.
34. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG, MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C/T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*. 2002;288(16):2023-31.
35. Jeng YL, Wu MH, Huang HB, Lin WY, You SL, Chu TY, Chen CJ, Sun CA. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C—>T polymorphism and lung cancer risk in a Chinese population. *Anticancer Res*. 2003;23:5149-52.
36. Woo KS, QiaoM, Chook P, Poon PY, Chan AK, Lau JT, Fung KP, Woo JL. Homocysteine, endothelial dysfunction, and coronary artery disease: emerging strategy for secondary prevention. *J Cardiol Surg*. 2002;17:432-5.
37. Mager A, Battler A, Birnbaum Y, Magal N, Shohat M. Plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and age at onset of symptoms of myocardial ischemia. *Am J Cardiol*. 2002;89:919-23.
38. Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphism to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;87:1361-6.

39. Guba, SC, Fink, LM, Fonseca V. Hiperhomocisteinemia and emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Am J Clin Pathol.* 1999;105:709-22.
40. Harrison SA, Brunt EM, Qazi RA, et al. Effect of significant histologic steatosis or steatohepatitis on response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:604-9.
41. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:75-85.
42. Poujol-Robert A, Rosmorduc O, Serfaty L, Coulet F, Poupon R, Robert A. Genetic and acquired thrombotic factors in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(3):527-31.
43. Herrero JJ, Quiroga J, Beloqui BSO, Pardo F, Cienfuegos JA, Prieto J. Hyperhomocysteinemia in liver transplant recipients: prevalence and multivariate analysis of predisposing factors. *Liver Transpl.* 2000;6:614-8.
44. Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1646-54
45. Mudd SHLH. Disorders in transsulfuration. In: Stanbury JBWJ, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, editors. *Metabolic bases of inherited diseases.* New York, NJ: McGraw-Hill Book; 1995. p.1279-327.
46. Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, et al. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet.* 1995;56:142-50.
47. Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:569-73.
48. Blom HJ. Genetic determinants of hyperhomocysteinemia: the roles of cystathionine beta-synthase and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Eur J Pediatr.* 2000;159(Suppl. 3):S208-12.

49. Tsai MY, Bignell M, Yang F, et al. Polygenic in fatty liverence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine betasynthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis*. 2000;149:131-7.
50. Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, et al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis*. 1999;143:163-70.
51. Joosten E, Van Den Berg A, Riezler R, et al. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr*. 1993;58:468-76.
52. Mason JB, Miller JW. The effects of vitamins B12, B6, and folate on blood homocysteine levels. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;669:197-203; discussion 03-4.
53. Wiliver Cirrhosisken DE, Wiliver Cirrhosisken B. B vitamins and homocysteine in cardiovascular disease and aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:361-70.
54. Lobo A, Naso A, Arheart K, et al. Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. *Am J Cardiol*. 1999;83:821-5.
55. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003;59:824-33.
56. Outinen PA, et al. 1999. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*. 1999;94:959-67.
57. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Nat. Acad Sci USA*. 1999;96:11041-8.
58. Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid synthesis. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:143-50.

59. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1263-73.
60. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* 2002;16(2):185-94.
61. Wetterau JR, Lin MCM, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochemi. Biophys Acta.* 1997;1345:136-50.
62. Lettéron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology.* 2003 Jul;38(1):133-40.
63. Berriot-Verrequeaux N, Aggerbeck M, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 663–97.
64. Karpe F, Lundahl B, Ehrenborg E, et al. A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:756-61.
65. Ledmyr H, McMahon AD, Ehrenborg E, Nielsen LB, Neville M, Lithell H, et al. The microsomal triglyceride transfer protein gene-493T variant lowers cholesterol but increases the risk of coronary heart disease. *Circulation.* 2004;109:2279-84.
66. Bernard S, Touzet S, Personne I, et al. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 2000;43(8):995-9.
67. Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, et al. Polymorphism of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese

- superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2004;40:781-6.
68. Richardson MM, Powell EE, Barrie HD, et al. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet.* 2005;42(7):e45.
69. The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NECP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
70. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from plasma fasting blood sugar and insulin concentration in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-9.
71. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1992;21:1983-5.
72. Mindicino HJ, Carlsen J, Tewari P, Aagaard O, Zhang B, Conarpe C. An evaluation of an automated homocysteine method on the Bayer ADVIA Centaur automated chemiluminescent system. *Clin Lab.* 2002;48:493-6.
73. Adinolfi LE, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Ant`o M, Capasso R, et al. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology.* 2005;41:995-1003.
74. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995;10:111-3.
75. Brunt EM, Janney C, Di Bisceglie A, Neuschwander-Tetri B, Bacon B. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histologic lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2467-74.

76. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med.* 2006;144:705-14.
77. Recife (PE). Prefeitura da Cidade do Recife. Recife - aspectos gerais. Disponível em: <http://www.recife.pe.gov.br/pr/secplanejamento/inforec/>.
78. Toniutto P, Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Fontanini E, Bitettore D, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and liver fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C. *Liver Int.* 2008;28(2):257-63.
79. Fabris C, Toniutto P, Falleti E, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, Fornasiere E, Fumolo E, Avellini C, Minisini R, Pirisi M. MTHFR C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009;33(1):102-7.
80. Jin F, Qu L-S, Shen X-Z. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2009;4:39.
81. Borgia G, Gentile I, Fortunato G, Borrelli F, Borelli S, Caterina M, et al. Homocysteine levels and sustained virological response to pegylated interferon α 2b plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C: a prospective study. *Liver Int.* 2008;1478-3223.
82. Silva VC, Ramos FJC, Freitas EM, de Brito-Marques PR, Cavalcanti MN, D'Almeida V, et al. Alzheimer's disease in Brazilian elderly has a relation with homocysteine but not with MTHFR polymorphisms. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64(4):941-5.
83. Bernard S, Touzet S, Personne I, Lapras V, Bondon PJ, Berthezène F, Moulin P. Association between microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism and the biological features of liver steatosis in patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 2000;43(8):995-9.
84. Gambino R, Cassader M, Pagano G, Durazzo M, Musso G. Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein: a link between liver disease and

- atherogenic postprandial lipid profile in NASH? *Hepatology*. 2007;45:1097-107.
85. 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 Metabol*. 2006;88:196-8.
 86. Mirandola S, Osterreicher CH, Marcolongo M, Datz C, Aigner E, Schlabrakowski A, Realdon S, Gerotto M, Alberti A, Stickel F. Microsomal triglyceride transfer protein polymorphism (-493G/T) is associated with hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29(4):557-65.
 87. Corey KE, Kane E, Munroe C, Barlow LL, Zheng H, Chung RT. Hepatitis C virus infection and its clearance alter circulating lipids: implications for long-term follow-up. *Hepatology*. 2009;50:1030-7.
 88. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol*. 2002;76:6919-28.
 89. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:12766-71.
 90. Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2007;46:411-9.
 91. Negro F. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut*. 2010;59:1279-87.
 92. Kumar D, Farrell GC, Fung C, et al. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes. Genotype-specific reversal of hepatic steatosis after sustained response to antiviral therapy. *Hepatology*. 2002;36:1266-72.
 93. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, et al. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38:75-85.