ARTHUR IVAN NOBRE OLIVEIRA

Influência dos polimorfismos nos genes *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) e *Transmembrane 6 Superfamily Member 2* (TM6SF2) na hepatite C crônica

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. Mário Guimarães Pessôa
Coorientador: Dr. Daniel Ferraz de Campos Mazo

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Arthur Ivan Nobre
Influência dos polimorfismos nos genes Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) na hepatite C crônica / Arthur Ivan Nobre Oliveira. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Mário Guimarães Pessôa.
Coorientador: Daniel Ferraz de Campos Mazo.

Descritores: 1.Hepatite C crônica 2.Polimorfismo de nucleotídeo único 3.Patatin-like phospholipase domain-containing 3 4.Transmembrane 6 Superfamily Member 2 5.Cirrose hepática

USP/FM/DBD-282/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais Ivanaldo
e Tereza Neuman, à minha esposa
Priscila, à minha princesa Marina, aos
meus irmãos Julliana e Jonas, pelo amor
e dedicação incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo privilégio do acesso à educação.

Às mulheres da minha vida:

... Tereza, minha linda mãe, pela dedicação e exemplo que sempre me impulsionaram para realizar cada um dos meus sonhos;

... Priscila, esposa amada e companheira da vida, por toda a paciência, parceria e dedicação à nossa família. Não teria conseguido sem você ao meu lado;

… Marina, minha filha e melhor presente, por completar a minha vida e me fazer querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

Dedico a vocês todas as minhas conquistas!

Ao meu irmão Jonas, por me inspirar a evoluir na Ciência, no academicismo e como pessoa. Tenho um orgulho imenso em ser seu irmão!

À minha irmã Julliana, minha primeira inspiração na Medicina, mostrou-me lá atrás que eu também poderia. Um exemplo de mãe, de dedicação à família e de profissional.

Aos meus amigos e às minhas cunhadas queridas, irmãos que a vida me deu, muito obrigado pelo carinho e apoio de sempre.

Ao meu orientador Dr. Mario Pessoa, médico e professor exemplar! Obrigado por me “apadrinhar” nessa pesquisa, pelos muitos ensinamentos e por todo a atenção e carinho. Foi uma honra ter sido seu aluno.

Ao meu coorientador Dr. Daniel Mazo, um dos maiores e mais completos médicos que já conheci! Obrigado por confiar em mim a continuidade do seu projeto. Obrigado pela incansável disponibilidade em ajudar, guiando de perto cada etapa dessa pesquisa. Você é a minha maior fonte de inspiração como

médico, professor e cientista. Espero ter feito jus à tanta dedicação.

À Drª Fernanda Malta e toda a sua equipe, pela competência e apoio técnico indispensáveis durante o processamento dos polimorfismos.

Ao Prof. Flair José Carrilho, que como titular do departamento sempre nos incentivou para o aprimoramento científico.

À Drª. Claudia Oliveira, pelo carinho e dedicação à Ciência em nossa instituição. Obrigado pelas excelentes sugestões para o aprimoramento desse trabalho.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, minha segunda casa por tantos anos. Sinto muito orgulho de ter feito parte da sua história.

Aos pacientes, que me estimulam a nunca parar de estudar. Eles dão sentido a qualquer esforço.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract

1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Hepatite C……..... 2
1.1.1 Importância clínica e epidemiologia…….....…… 2
1.1.2 Vírus da hepatite C…….....……. 3
1.1.3 História natural da doença: Hepatite C aguda….....…… 4
1.1.4 História natural da doença: Hepatite C crônica…….....….... 5
1.1.5 Diagnóstico……..... 6
1.1.6 Tratamento…….....…. 7
1.2 O gene PNPLA3…….....…..... 9
1.2.1 PNPLA3 e a DHGNA……..... 14
1.2.2 Distribuição regional dos polimorfismos do PNPLA3….....…. 15
1.2.3 PNPLA3 e síndrome metabólica……..... 15
1.2.4 PNPLA3 e hepatite C crônica……...……..... 17
1.2.5 PNPLA3 e outras hepatopatias.....……..……..... 22
1.3 O gene TM6SF2……...……..... 23
1.3.1 TM6SF2 e DHGNA…….....…..... 25
1.3.2 TM6SF2 e hepatite C crônica……..... 26
2. OBJETIVOS..... 29
2.1 Objetivo principal..... 30
2.2 Objetivo secundário..... 30
3. MÉTODOS..... 31
3.1 Critérios de inclusão..... 32
3.2 Critérios de exclusão..... 33
3.3 Variáveis e definições..... 33

3.3.1 Características demográficas e antropométricas..... 33
3.3.2 Antecedentes patológicos e hábitos de vida..... 33
3.3.3 Variáveis laboratoriais..... 33
3.3.4 Definição de resistência insulínica e síndrome metabólica..... 34
3.3.5 Definição de hepatite C crônica..... 34
3.3.6 Histologia hepática..... 35
3.4 Avaliação dos polimorfismos nos genes PNPLA3 e TM6SF2..... 36
3.4.1 Extração do DNA genômico..... 36
3.4.2 Genotipagem dos polimorfismos do gene PNPLA3..... 37
3.4.3 Genotipagem dos polimorfismos do gene TM6SF2..... 38
3.5 Análise estatística..... 38
3.6 Aspectos éticos..... 40

4. RESULTADOS..... 41

5. DISCUSSÃO..... 53

6. CONCLUSÕES..... 69

7. ANEXOS..... 71
7.1 Aprovação do projeto de pesquisa pela comissão de ética e pesquisa do HC-FMUSP..... 72
7.2 Termo de consentimento livre e esclarecido..... 74

8. REFERÊNCIAS..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanino aminotransferase
AP-1	Proteína ativadora 1
AST	Aspartato aminotransferase
CCL2	Ligante 2 da quimiocina CC, do inglês *C-C Motif Chemokine ligand 2*
CCL5	Ligante 5 da quimiocina CC, do inglês *C-C Motif Chemokine ligand 5*
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAAs	Drogas antivirais de ação direta
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DP	Desvio padrão
ECV	Evento cardiovascular
ET AL.	E outros
GGT	Gamaglutamil transferase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GWAS	Estudo com associação genômica ampla, do inglês *genome-wide association study*
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase, do inglês *Homeostatic Model of Assessment*
IC	Intervalo de confiança
TIMP 1 e 2	Inibidores teciduais da metaloproteinase 1 e 2
IMC	Índice de massa corpórea
IRES	Sítio interno de entrada do ribossomo, do inglês *internal ribosome entry site*
JNK/AP	c-Jun n-terminal quinase
MMP	Matriz de metaloproteinase

NASH	Esteatohepatite não alcoólica, do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*
NCR	Região não codificante, do inglês *Noncoding Region*
OR	Razão de chances, do inglês odds ratio
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
PIC	Conteúdo de informação polimórfica, do inglês *Polymorphism Information Content*
PNPLA3	*Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3*
RVS	Resposta virológica sustentada
SM	Síndrome Metabólica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *Single nucleotide polymorphism*
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicerídeos
TM6SF2	*Transmembrane 6 Superfamily Member 2*
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
$\chi 2$	Teste do Qui-quadrado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resumo dos principais estudos que avaliaram a influência do PNPLA3 - rs738409 na hepatite C crônica..... 21

Tabela 2 Resumo dos principais estudos que avaliaram a influência do TM6SF2 – rs58542926 na hepatite C crônica..... 27

Tabela 3 Correlação entre as classificações anatomopatológicas de hepatite C crônica ……..... 36

Tabela 4 Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos pacientes com HCV ……..... 43

Tabela 5 Características histopatológicas dos pacientes com HCV.... 43

Tabela 6 Testes do Equilíbrio de Hardy–Weinberg dos genótipos do PNPLA3 e TM6SF2…….....……..... 44

Tabela 7 Frequências dos polimorfismos do PNPLA3 e TM6SF2 em pacientes saudáveis e pacientes com HCV…….....… 45

Tabela 8 Características dos pacientes com HCV de acordo com os polimorfismos do PNPLA3..... 46

Tabela 9 Características dos pacientes com HCV de acordo com os polimorfismos do TM6SF2 (n=362) …..……..... 47

Tabela 10 Associação dos polimorfismos do PNPLA3 e TM6SF2 com alterações da histologia hepática em pacientes com HCV…….....…. 48

Tabela 11 Fatores de risco para fibrose hepática significativa em pacientes com HCV…….....… 49

Tabela 12 Fatores de risco para esteatose hepática em pacientes com HCV ……..……..... 51

Tabela 13 Fatores de risco para atividade necroinflamatória hepática moderada a intensa em pacientes com HCV..... 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modelo esquemático da influência da I148M PNPLA3 no desenvolvimento de DHGNA..... 11

Figura 2 Mecanismos moleculares do PNPLA3 nas células estreladas..... 13

Figura 3 Modelo esquemático da influência do TM6SF2 no desenvolvimento de DHGNA e risco cardiovascular..... 24

RESUMO

Oliveira AIN. *Influência dos polimorfismos nos genes Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) na hepatite C crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: Apesar dos conhecimentos crescentes a respeito dos polimorfismos dos genes TM6SF2 e PNPLA3, a sua influência no espectro da da doença hepática crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) ainda não está totalmente definida. Além disso, populações miscigenadas, como a brasileira, não foram incluídas na maioria dos estudos. O objetivo desde estudo foi descrever a prevalência destes polimorfismos em brasileiros com hepatite C crônica e avaliar a sua associação com fibrose hepática e outros componentes da síndrome metabólica. **Métodos:** Estudo transversal e unicêntrico que avaliou 365 pacientes com hepatite C crônica, virgens de tratamento, e 134 indivíduos saudáveis. Os polimorfismos do PNPLA3 (rs738409 c.444C>G) e do TM6SF2 (rs58542926 c.449C>T) foram avaliados. **Resultados:** Entre os saudáveis, as frequências do TM6SF2 CC e CT + TT foram de 93.28% e 6.72%, respectivamente; estas foram 88.95 % e 11.05% em pacientes com o HCV. Em relação ao PNPLA3, dentre os saudáveis, as frequências de CC e CG + GG foram 49.25% e 50.74%, respectivamente; estas foram 51.37% e 48.63% entre os pacientes com HCV. Em pacientes com hepatite C, pela análise univariada, os genótipos TM6SF2 CT + TT foram associados com fibrose hepática significativa (p=0,0471, OR 1,953, IC95% 1,009-3,788) em comparação com genótipo CC, enquanto este foi associado com idade mais avançada (p=0,0024), maior frequência de hipertensão arterial sistêmica (p=0,0327), obesidade (p=0,0309), síndrome metabólica (p=0,0141) e níveis mais elevados de colesterol total (p=0.0360), em comparação aos genótipos CT + TT. Portadores de VHC com o PNPLA3 GG tiveram menor IMC (p=0,0469) e menor frequência de síndrome metabólica (p=0,0137) do que os indivíduos CG + CC. Nenhum dos polimorfismos foi associado de forma independente com esteatose hepática ou fibrose. **Conclusões:** A presença dos genótipos TM6SF2 CT + TT foi associada com fibrose hepática significativa em pacientes com HCV, o mesmo não sendo observado para os polimorfismos do PNPLA3.

Descritores: Hepatite C crônica; Polimorfismo de nucleotídeo único; *Patatin-like phospholipase domain-containing 3*; *Transmembrane 6 Superfamily Member 2*; Cirrose hepática.

ABSTRACT

Oliveira AIN. *Influence of polymorphisms on the Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) and Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) genes in chronic hepatitis C* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introduction: Despite the growing body of knowledge about TM6SF2 and PNPLA3 polymorphisms, their influence in the spectrum of HCV liver disease is not yet fully defined. Moreover, admixed populations, such as Brazilians, were not included in most studies. The aim of this study was to describe the prevalence of these polymorphisms in Brazilians with chronic hepatitis C, and to assess their association with liver fibrosis and other components of the metabolic syndrome. **Methods:** This single center cross-sectional study enrolled 365 patients with chronic hepatitis C, naïve for antiviral therapy, and 134 healthy individuals. PNPLA3 (rs738409 c.444C>G) and TM6SF2 (rs58542926 c.449C>T) polymorphisms were evaluated. **Results:** In healthy subjects, the frequencies of TM6SF2 CC and CT + TT were 93.28% and 6.72%, respectively; these were 88.95 % and 11.05% in patients with HCV. Regarding PNPLA3, in healthy subjects, the frequencies of CC and CG + GG were 49.25% and 50.74%, respectively; these were 51.37% and 48.63% in patients with HCV. In the univariate analysis, TM6SF2 CT + TT genotypes in HCV was associated with significant liver fibrosis among patients with HCV (p=0.0471, OR 1.953, 95%CI 1.009-3.788). TM6SF2 CC genotype in patients with HCV was associated with older age (p=0,0024), higher frequency of arterial hypertension (p=0.0327), obesity (p=0.0309), metabolic syndrome (p=0.0141), and total cholesterol (p=0.0360), in comparison to CT + TT genotype. PNPLA3 GG subjects had lower BMI (p=0,0469) and less metabolic syndrome (p=0.0137) than CG / CC individuals. None of the polymorphisms were independently associated with hepatic steatosis or fibrosis. **Conclusions**: The presence of the TM6SF2 CT + TT genotype was associated with significant liver fibrosis in patients with HCV, but not the PNPLA3 polymorphisms.

Descriptors: Hepatitis C, chronic; Polymorphism, single nucleotide; Patatin-like phospholipase domain-containing 3; Transmembrane 6 Superfamily Member 2; Liver cirrhosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1- HEPATITE C

1.1.1- Importância clínica e epidemiologia

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas de doença hepática em todo o mundo, com prevalência aproximada de 1% da população geral.[1] As suas formas graves estão associadas a elevada morbimortalidade, com uma média global de 400 mil óbitos por ano.[2] Acredita-se que cerca de 24% dos casos de cirrose e até 50% dos casos de carcinoma hepatocelular (CHC) estejam diretamente relacionados ao HCV.[2]

Apesar da ascensão da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e mesmo com as ótimas taxas de resposta virológica sustentada (RVS) com os novos antivirais de ação direta (DAAs), o HCV permanece como a principal causa de transplante hepático, responsável por aproximadamente 30% de todos os transplantes realizados na Europa e América do Norte na última década.[3]

No Brasil, entre os anos de 1999 a 2018, foram notificados 174.793 casos de hepatite C com os marcadores anti-HCV e HCV-RNA reagentes, destes, 63,1% ocorreram no Sudeste, 25,2% no Sul, 6,1% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte.[4] O último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde em 2019 revelou uma soroprevalência de anti-HCV em 0,7% da população brasileira. O HCV é ainda a mais frequente causa de morte dentre as hepatites virais no Brasil, com coeficiente de mortalidade de cerca de um caso a cada 100.000, valor mantido estável nos últimos anos.[4]

1.1.2- Vírus da hepatite C

O HCV é um vírus RNA de fita única e polaridade positiva que possui aproximadamente 9.600 bases e pertence ao gênero *Hepacivirus e* à família *Flaviviridae*. O RNA viral é composto por sequências não traduzidas nas extremidades 5' e 3' conhecidas como regiões não codificantes (NCR); na região 5' encontra-se um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES), capaz de direcionar a tradução do genoma viral, enquanto a região 3' é responsável pelo início da replicação do genoma viral. O vírus apresenta ainda uma única região com fase aberta de leitura, composta pela maior parte do genoma viral e responsável por codificar uma poliproteína com 3006 a 3037 códons.[5]

Essa poliproteína é clivada por proteases celulares e virais dando origem às proteínas estruturais do envelope nuclear (E1, E2 e a proteína de capsídeo) e proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). Estas últimas são responsáveis por coordenar a replicação intracelular do vírus, incluindo síntese de RNA, modulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e montagem da partícula viral. A NS5B destaca-se dentre as proteínas não estruturais pelo seu papel como RNA polimerase responsável por regular a replicação do genoma viral, tendo sido alvo dos primeiros antivirais de ação direta.[6, 7]

Através da análise filogenética do HCV, foram descritos sete genótipos principais, além de 67 subtipos.[8] Em uma análise global, o tipo mais prevalente é o genótipo 1, com cerca de 45% dos casos; seguido pelo genótipo 3 (22%) - o tipo predominante na Índia; genótipo 2 (13%) - mais frequente na África ocidental; genótipo 4 (13%) - comum no norte da África;

genótipo 6 (2%), típico da Tailândia, e o genótipo 5 (1%) - mais frequente no sudeste da África.[9] O genótipo 7, mais raro, foi recentemente descrito em países da África central.[10] No Brasil, poucas publicações avaliaram a distribuição dos genótipos, porém se estima uma frequência de 64,9% a 77,2% para o genótipo 1, 4,6% a 13,6% para o genótipo 2, entre 9 e 30,9% para o genótipo 3, 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o tipo 5, sendo os dois últimos observados principalmente no estado de São Paulo.[11]

1.1.3- História Natural da doença: Hepatite C aguda

A hepatite C aguda costuma apresentar evolução subclínica, em que a maioria dos pacientes permanece assintomática (70-80%) e os sintomas, quando presentes, são inespecíficos, como hiporexia e fadiga. A icterícia é incomum e as formas agudas graves são extremamente raras, com menos de 1% dos casos na forma fulminante.[12]

A detecção sérica do RNA viral pode ocorrer cerca de duas semanas após o contato com o vírus. Os anticorpos Anti-HCV surgem de forma tardia, entre 30 e 60 dias após a exposição.[13] Os sintomas habitualmente manifestam-se após quatro a doze semanas. Conceitualmente, a fase aguda pode durar até seis meses, mas a sua resolução costuma ocorrer dentro dos primeiros três meses de evolução.[13]

A eliminação viral espontânea ocorre em uma minoria dos casos (entre 18 e 34%) e está sabidamente associada à idade mais jovem (abaixo de 40 anos), sexo feminino e ao aparecimento de icterícia durante o quadro agudo.[14] Os genes IL-28B e o alelo DQB1/0301 do complexo principal de

histocompatibilidade de classe II também estão associados a maiores taxas de cura espontânea.[14, 15] O desaparecimento do HCV não implica em imunidade contra o vírus, mantendo o risco de reinfecção, principalmente em populações mais vulneráveis.

1.1.4- História Natural da doença: Hepatite C crônica

Após a infecção aguda pelo HCV, estima-se que 55 a 85% dos pacientes desenvolverão doença hepática crônica e, destes, 15 a 20% chegarão até a fase de cirrose.[12]. A hepatite C crônica é caracterizada por um processo inflamatório lento e persistente ao longo de duas a três décadas de evolução, com 10 a 30% dos pacientes desenvolvendo cirrose após este período.[12] Uma vez nesta fase, existe um risco anual de 2 a 5% de descompensação hepática (definida pelo aparecimento de ascite, peritonite bacteriana espontânea, hemorragia varicosa e/ou encefalopatia hepática), além da probabilidade de 1 a 5% de desenvolvimento de CHC.[16, 17] A mortalidade é variável, mas se estima uma sobrevida global de 85 a 91% em cinco anos para cirrose compensada, com importante redução da expectativa de vida após o primeiro episódio de descompensação.[16]

A esteatose hepática é complicação frequente da infecção crônica pelo HCV, acometendo entre 50 e 72% dos pacientes.[18] Os principais fatores de risco associados a esteatose são o genótipo viral 3, além de fatores do hospedeiro como presença de componentes da síndrome metabólica [em especial obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2)], consumo excessivo de álcool e o perfil genético.[19] A coexistência de esteatose e hepatite crônica

traz implicações prognósticas e terapêuticas, com maior risco de progressão da fibrose, complicações hepáticas e redução das taxas de sucesso do tratamento antivirais com interferon.[20, 21]

A interação entre fatores virais, ambientais e genéticos do hospedeiro determina a evolução da doença hepática e o risco de complicações. Dentre os fatores sabidamente associados à progressão da doença hepática crônica destacam-se: idade no momento infecção, tempo de doença, sexo masculino, ingesta abusiva de álcool, obesidade; resistência insulínica / DM2; coinfecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV), HIV ou esquistossomose; presença de esteatose hepática e uso concomitante de terapia imunossupressora.[13, 22]

O perfil genético do paciente exerce papel de destaque na evolução da doença. O gene IL28B, por exemplo, codifica o interferon-lambda-3 e influencia as taxas de resposta ao tratamento com interferon e a probabilidade de *clearance* viral espontâneo. O genótipo IL28B CC mostrou relação com grau de atividade necroinflamatória hepática, elevação de transaminases e piores desfechos clínicos.[13] Os polimorfismos dos genes *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) e *Transmembrane 6 Superfamily Member 2* (TM6SF2) têm ganhado evidência na última década e serão melhor descritos ao longo do texto.

1.1.5- Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HCV deve ser realizado pela combinação de sorologia positiva (anti-HCV *IgG*) e detecção sérica do RNA viral. O anti-HCV isoladamente é marcador de contato prévio com o vírus e

exige complementação com testes moleculares que detectem o HCV-RNA circulante. O teste sorológico pode ser realizado por imunocromatografia de fluxo (teste rápido) ou por métodos de imunoensaio padronizados do tipo *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).[23]

O exame de genotipagem do HCV utiliza testes moleculares capazes de identificar os genótipos, subtipos e populações mistas. A metodologia exige que a amostra apresente carga viral mínima de 500 UI/ml.[23]

1.1.6- Tratamento

Atualmente recomenda-se o tratamento universal dos portadores do HCV, independente do estágio da doença, e deve seguir as recomendações específicas do Ministério da Saúde do Brasil, recentemente atualizadas.[24] A meta do tratamento é a cura da infecção, representada pela resposta virológica sustentada (RVS) por meio da negativação do HCV RNA após 12 ou 24 semanas do fim do tratamento antiviral.[24, 25]

Antes do advento dos novos DAAs, o tratamento da hepatite C com a combinação de interferon alfa peguilado e ribavirina atingia baixas taxas de RVS e era associada a diversos eventos adversos, muitas vezes proibitivos. O lançamento das DAAs revolucionou o tratamento com inúmeras vantagens, dentre elas menor duração, facilidade posológica, boa tolerabilidade, poucos eventos adversos e melhores resultados. Distribuem-se em quatro classes principais de drogas: análogos nucleotídeos da NS5B; inibidores da NS5A e inibidores da protease (NS3) e os inibidores não nucleosídeos da NS5B.

Todas compartilham a ação antiviral direta e o efeito inibitório sobre a replicação viral.[24]

A escolha do esquema terapêutico deve considerar genótipo viral; presença ou não de cirrose e, quando presente, se compensada ou não; função renal de base; histórico de tratamento antiviral anterior (especialmente se uso prévio de inibidor da protease de primeira geração), interações medicamentosas e a presença de coinfecção com HIV e/ou HBV. [24, 25]

A RVS parece reduzir o processo inflamatório hepático e regredir a lesão hepática, eventualmente reduzindo a hipertensão portal, o risco de CHC e a mortalidade geral.[26, 27] A erradicação do vírus também proporciona melhora das manifestações extrahepáticas.[27, 28]

1.2 O GENE PNPLA3

O gene *patatin-like phospholipase-3*, pertencente à família das fosfolipases semelhantes à patatina, localiza-se no cromossomo 22 e é responsável por codificar uma proteína de membrana de 481 aminoácidos, também conhecida por adiponutrina. Essa proteína é expressa nos hepatócitos, células estreladas hepáticas e na retina e se concentra no retículo endoplasmático e na superfície das gotículas lipídicas.

A adiponutrina é uma enzima multifuncional com papel de lipase de triacilglicerol e também atividade de acilglicerol O-aciltransferase. Assim, ela regula a hidrólise hepática de triglicerídeos (TG) e ésteres de retinil, atuando na remodelação das gotículas de lipídios nos hepatócitos e na liberação de retinol em resposta a sinais metabólicos nas células estreladas hepáticas.[29-32] Ela é uma das enzimas reguladoras do metabolismo energético e parece envolvida no equilíbrio dinâmico entre consumo e armazenamento de energia, sendo sua expressão altamente sensível à mobilização de energia e à deposição tecidual de gotículas de gordura.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são a forma mais comum de variação na sequência do DNA humano, sendo constituídos pela troca de um único nucleotídeo (adenina, timina, citosina ou guanina) por outro, ocorrendo em uma frequência maior do que 1% da população geral. Dois terços dos SNPs ocorrem pela substituição de uma citosina (C) por uma timina (T).[33] Devido à sua relativa estabilidade, os polimorfismos podem ser utilizados para avaliar padrões de herança e como marcadores de ancestralidade.

A primeira variante genética identificada por estudos de associação genômica ampla (GWAS) na DHGNA foi a I148M do gene PNPLA3, caracterizada pela substituição de isoleucina por metionina no códon 148, através da mudança de um nucleotídeo C por um G (rs738409 c.444 C>G, p. I148M).[33] Esta alteração estrutural leva à síntese de uma adiponutrina disfuncional, com comprometimento da sua função enzimática habitual e redução da sua atividade de lipase, o que leva ao acúmulo progressivo de proteína PNPLA3 anormal na superfície das gotículas lipídicas e compromete a mobilização hepática de ácidos graxos e sua degradação, além de inibir o acesso de outras lipases.[34] Esse processo favorece a deposição hepatocelular de triglicérides e consequente esteatose.[35, 36] O modelo teórico através da qual a variante I148M do PNPLA3 favorece o desenvolvimento de DHGNA é mostrado na Figura 1.

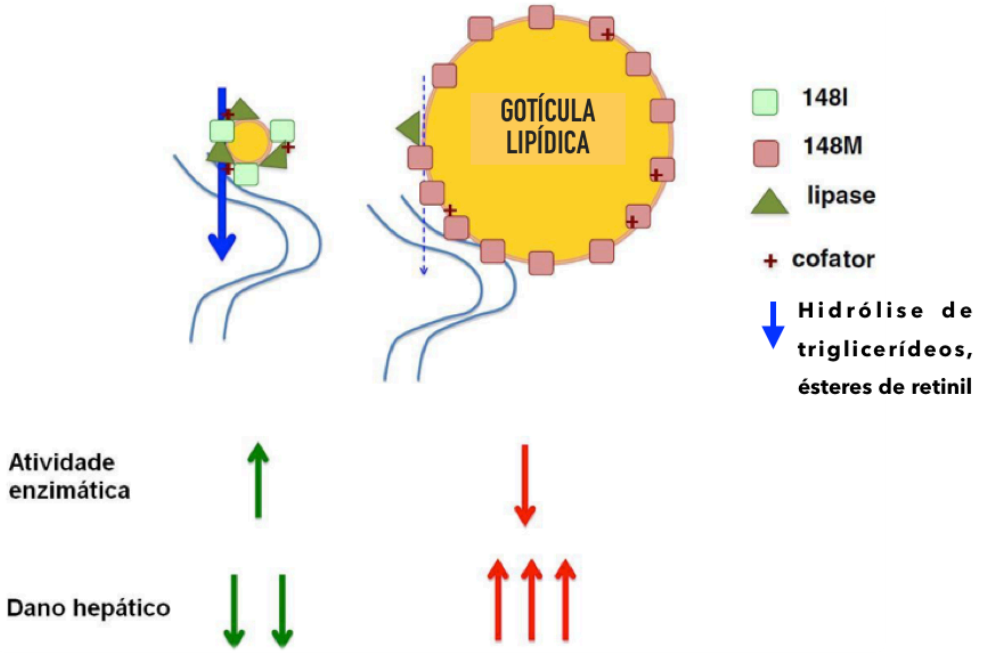

Figura 1. Modelo esquemático da influência da I148M PNPLA3 no desenvolvimento de DHGNA. As setas azuis representam a hidrólise de triglicerídeos e ésteres de retinil, além da exportação de lipoproteína a partir da gotícula lipídica (representada pelos círculos amarelos). O gene PNPLA3 é representado pelo quadrado verde (variante I148I protetora) e vermelho (perda de função, variante I148M de risco), cujo número é proporcional aos níveis da sua proteína. Outras lipases são indicadas pelos triângulos verdes, enquanto que seus cofatores são indicados por cruzes. As setas na parte inferior da figura representam o efeito sobre atividade enzimática e dano hepático. A variante funcional 148I PNPLA3 permite a hidrólise de triglicerídeos em combinação com outras lipases e cofatores. Em contraste, a variante de perda de função 148M determina acúmulo de PNPLA3 disfuncional na superfície das gotículas lipídicas, dificultando o acesso de outras lipases aos triglicerídeos e/ou cofatores essenciais. **Abreviaturas**: DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica; PNPLA3, *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3*. ***Adaptado de Dongiovanni P et al.***[35]

O metabolismo das células estreladas hepáticas parece ser influenciado pelo PNPLA3 através de mecanismos diferentes daqueles envolvidos com o acúmulo hepático de gorduras. Pirazzi et al. (2014) foram os primeiros a estudar o papel do PNPLA3 no metabolismo hepático do retinol. Os autores avaliaram experimentalmente células estreladas hepáticas humanas e observaram que a PNPLA3 atua na hidrólise do retinil palmitato em retinol e ácido palmítico, e que esse processo seria regulado pelo estímulo

da insulina. A variante I148M levaria a uma maior concentração intra-hepática de ésteres de retinol em detrimento de menores níveis séricos de retinol.[37] Em seguida, Pingitore et al. (2016) observaram que a variante I148M é capaz de desregular mecanismos de *feedback* negativo da adiponutrina relacionados à expressão tecidual da matriz de metaloproteinase 2 (MMP) e dos inibidores teciduais da metaloproteinase 1 e 2 (TIMP1 e TIMP2).[38] Tal processo, em conjunto com o desequilíbrio do conteúdo intracelular dos ácidos graxos, predispõe à progressão da fibrose.[39]

Mais recentemente, Bruschi et al. (2017) mostraram que a expressão da variante I148M está associada a um padrão fenotípico mais inflamatório e fibrogênico das células estreladas hepáticas.[40] O desbalanço do conteúdo hepático de gorduras e acúmulo de gotículas lipídicas nas células estreladas leva ao aumento dos níveis de ácidos graxos pró inflamatórios, os quais ativam fatores de transcrição pertencentes à proteína ativadora (AP-1), incluindo a via da c-Jun N-terminal quinase (JNK), o que estimula a proliferação celular e induz a secreção de mediadores inflamatórios.

Os experimentos sugerem que as células estreladas em portadores do polimorfismo, comparados à forma selvagem, recrutam maior quantidade de células de defesa, em especial monócitos, o que resulta em maior liberação de citocinas pró inflamatórias e fibrogênicas, tais quais a ligante 5 da quimiocina CC (CCL5), a ligante 2 de quimiocina CC (CCL2), a Interleucina-8 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fatores tipicamente associados à migração de células imune.[40, 41] Os principais mecanismos envolvidas estão esquematizados na Figura 2.

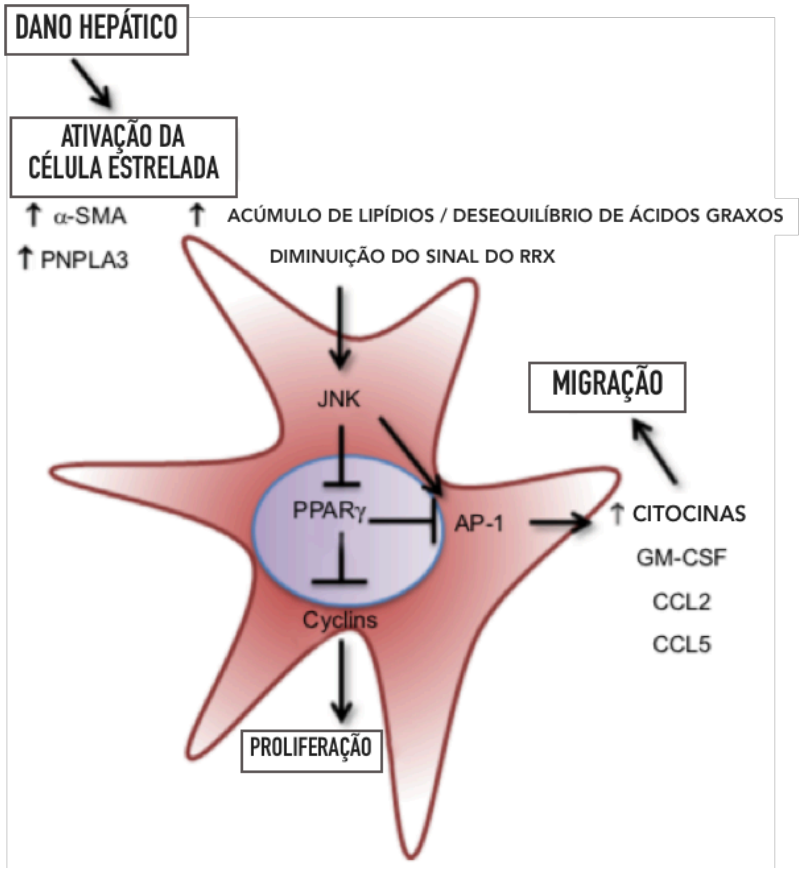

Figura 2. Mecanismos moleculares do PNPLA3 nas células estreladas. Abreviaturas: AP-1: proteína ativadora 1; FFA: ácidos graxos de cadeia livre; JNK: proteína quinase c-Jun N-terminal; PPARγ: *peroxisome proliferator activated receptor gamma*; PNPLA3: *patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene*; RRX: receptor retinóide X; SMA, actina-alfa de músculo liso. ***Adaptado de Bruschi et al.***[41]

Certos fatores ambientais também parecem influenciar a expressão fenotípica do PNPLA3, dentre eles o consumo abusivo de álcool, presença de obesidade central, sobrecarga de ferro e/ou cobre e o consumo excessivo de carboidratos e ácidos graxos poli-insaturados (omega 6 e omega 3).[42] Nesse contexto, o impacto da coexistência de hepatite viral crônica com os polimorfismos do PNPLA3 tem sido alvo de estudos nos últimos anos.

1.2.1- PNPLA3 e a DHGNA

Sucessivos estudos com GWAS têm revelado associações fortes e reprodutíveis entre certas variantes genéticas e a história natural da DHGNA. Estes resultados têm ampliado os conhecimentos sobre a biologia da doença e sugerido novos alvos prognósticos e terapêuticos em potencial.[34]

Romeo et al. (2008) examinaram 9.229 polimorfismos de nucleotídeo único em 2.051 norte-americanos do *Dallas Heart Study* e observaram pela primeira vez que a variante I148M do PNPLA3 está associada ao acúmulo hepático de triacilglicerol.[33] Outros estudos com GWAS realizados posteriormente também encontraram a associação positiva entre o SNP e a DHGNA.[43, 44]

Estudos independentes, utilizando coortes de pacientes adultos e pediátricos com DHGNA de diferentes etnias, replicaram os achados dos estudos de GWAS e observaram a associação da variante I148M do PNPLA3 com elevação persistente de ALT e AST, esteatose e fibrose.[45-47] Alguns autores mostraram ainda a existência de um efeito de dose, com o heterozigoto (CG) apresentando risco intermediário entre os homozigotos CC e GG para a progressão da doença hepática.[46]

Mazo et al. (2019), em publicação com 248 pacientes com diagnóstico histológico de DHGNA, demonstraram pela primeira vez em brasileiros que os genótipos CG e GG, quando comparados ao CC, apresentam maior risco de DHGNA (CG x CC = OR:1,757, IC95% 1,037–2,977 e GG × CC: = OR:3,296, IC95% 1,504–7,225). Dentro do grupo de pacientes com esteatohepatite não alcoólica (NASH), observaram ainda que o genótipo GG tem associação com

níveis mais elevados de aspartato aminotransferase (AST) e com maior frequência de fibrose significativa (F2-F4, p=0,0272).[48]

1.2.2- Distribuição regional dos polimorfismos do PNPLA3

Dados da literatura sugerem que as variações de prevalência da DHGNA entre as diferentes etnias tenha origem genética e que os polimorfismos do gene PNPLA3 desempenham um papel importante nesse cenário.[33, 49, 50]

O estudo seminal com GWAS de Romeo et al. (2008) mostrou que hispânicos apresentam maior frequência do alelo G (49%) em relação aos europeus-americanos (23%) e afro-americanos (17%), o que poderia explicar parcialmente a maior prevalência de DHGNA no primeiro grupo em relação aos demais.[33] Revisão sistemática publicada por Tyler J et al. (2016) encontrou o alelo G em 26,2% das pessoas avaliadas, enquanto o alelo C estava em 73,8%. O genótipo GG estava em 9,3% dos pacientes. Nesse grupo, os africanos apresentavam as menores prevalências do genótipo GG (2,4%), enquanto os latino-americanos lideraram com 24,5%, asiáticos com 14,1%, europeus com 5,4% e nativos do sudeste asiático com 7%.[51]

1.2.3- PNPLA3 e síndrome metabólica

Existem poucos dados na literatura sobre a relação do gene PNPLA3 com os fatores da síndrome metabólica (SM). Alguns trabalhos sugeriram que exista associação entre a variante I148M do PNPLA3 e resistência à insulina, independente de glicemia e IMC [33, 49, 50, 52, 53] No entanto, outros trabalhos

mostraram resultados divergentes. Meta-análise publicada em 2011 pesquisou a relação dos genótipos do PNPLA3 com o índice de massa corpórea (IMC) e níveis séricos de glicose, mas não observou associação significante.[54] Outros dois trabalhos europeus também obtiveram resultados negativos: um deles com 592 pacientes não mostrou associação da variante I148M com IMC, dislipidemia ou DM2[55]; o outro incluiu 330 pacientes alemães e mostrou que embora associado à DHGNA, esse genótipo não apresentava relação com resistência insulínica.[56]

Alguns autores defendem que a presença de fatores da SM possa interferir com a expressão dos polimorfismos genéticos, porém outros trabalhos também mostram resultados divergentes. Estudo japonês com 824 indivíduos observou que a relação entre o alelo G do gene PNPLA3 e a DHGNA é mais forte em pacientes magros ou com sobrepeso, do que no grupo com obesidade.[57] Petta et al. (2015) corroboraram esse achado em uma população de 434 pacientes com HCV, na qual o alelo G do PNPLA3 foi associado a maior gravidade da esteatose e NASH no grupo dos pacientes não obesos.[58] Shen J. et al. (2014) também observaram que o PNPLA3 rs738409 aumentava o risco de DHGNA na população geral, porém com maior intensidade em pacientes sem SM, independente do padrão dietético.[59] Outro trabalho publicado em 2015, com uma população de 1018 asiáticos com HCV, observou risco 2,3 vezes maior de esteatose hepática em pacientes com o genótipo GG; no entanto, na análise de subgrupo, essa relação foi estatisticamente significativa apenas para os pacientes não obesos (IMC < 24kg/m^2).[60]

De forma oposta, estudo recente publicado por Stender et al. (2017) sugeriu que exista um efeito aditivo entre o IMC e o polimorfismo do PNPLA3, aumentando o risco de esteatose e de progressão da doença hepática quanto maior for o IMC do indivíduo.[61] Huang C. et al. (2015), em estudo com 1077 pacientes com HCV subdividiram os pacientes com genótipo GG em portadores de DM2 ou não, e observaram que os primeiros apresentavam risco maior de fibrose avançada (OR: 2.20; IC95% 1,026–4,734; p=0.04), sugerindo sinergismo entre os fatores.[62]

Curiosamente, alguns trabalhos observaram que os pacientes com DHGNA portadores do SNP respondem melhor as modificações dietéticas e de hábitos de vida em relação aos pacientes portadores do alelo C, tanto do ponto de vista hepático, com maior redução do conteúdo de gordura, quanto do ponto de vista metabólico, com maior redução da resistência insulínica.[53, 63, 64] No entanto, estudos adicionais em coortes populacionais bem caracterizadas ainda são necessários para confirmar essa tendência.

1.2.4- PNPLA3 e hepatite C crônica

A partir dos resultados iniciais obtidos com DHGNA, alguns autores passaram a pesquisar a influência do gene PNPLA3 nos portadores do HCV, acreditando que os mecanismos virais possam interagir com os polimorfismos genéticos, trazendo potenciais consequências deletérias aos seus portadores.

Trépo et al. (2011) estudaram um grupo de 537 pacientes europeus com HCV e observaram que os portadores do genótipo GG do PNPLA3 apresentavam maior risco de esteatose (OR:2,55; IC95% 1,08-6,03; p=0,034),

fibrose (OR:3,13; IC95% 1,50-6,51; p=0,002) e progressão da fibrose (OR:2,64; IC95% 1,22-5,67; p=0,013).[65] Cai et al. (2011) observaram em uma coorte de 626 pacientes com HCV que o SNP do PNPLA3 está associado a risco aumentado de esteatose (OR:1,9; IC95% 1,6-2,3; p<0,001), exceto em pacientes com o genótipo 3.[66] No mesmo ano, Valenti et al. (2011) publicaram estudo com 325 italianos no qual observaram relação independente do genótipo GG com a presença de esteatose (OR:1,35; IC95% 1,04-1,76; p=0,02) e fibrose de qualquer grau (OR:1,5; IC95% 1,09-2,12; p<0,01) e NASH (OR:1,5, IC95% 1,12-2,04; p=0,007).[67]

Na sequência, dois estudos foram publicados com coortes exclusivamente asiáticas. Huang CF et al (2015) estudaram 1077 pacientes e observaram que o gene PNPLA3 está associado a risco aumentado de fibrose em pacientes diabéticos, independente do método de análise, tanto pelo modelo recessivo de herança (OR: 4,53; IC95%: 1,356-15,106; p=0,014), quanto pelo modelo dominante (OR: 2,20; IC95%: 1,026-4,734; p=0,04). Yasui et al. (2015), por sua vez, analisaram 276 pacientes japoneses e observaram que o genótipo GG foi independentemente associado com a presença de esteatose (OR: 2,58; IC95%:1,37-4,84, p=0,003), atividade necroinflamatória grave (OR: 2,16; IC95%:1,12-4,16; p=0,02) e fibrose avançada (OR: 2,10; IC 95%:1,07-4,11; p=0,03).

Em 2017, estudo realizado por Kupcinskas et al. comparou um grupo de 317 indivíduos com cirrose, 154 com fibrose hepática de qualquer grau e 498 controles saudáveis, todos caucasianos e oriundos da Lituânia. Eles

encontraram que o SNP rs738409 estava associado a maior risco de desenvolver fibrose (OR:1,65; p=0,01) e cirrose (OR:1,92; p=0,005). Os resultados se mantiveram significativos nos modelos de herança dominante (OR:1,98, p=0,002 e OR:1,67; p=0,008, respectivamente) e recessivo (OR: 3,94, p=0,0005 e OR:3,02, p=0,003, respectivamente).[68]

Dois trabalhos mais recentes também avaliaram o tema, porém agora com desenho longitudinal. Crisan et al. (2019) observaram prospectivamente o impacto da variante I148M do PNPLA3 na esteatose, fibrose e progressão da fibrose em 250 pacientes com biópsia hepática por HCV. Desse grupo, 98 pacientes foram seguidos com elastografia transitória por uma média de 62,85 meses (IC95% 52,21 - 76,15). Os autores encontraram uma forte associação do alelo G do gene PNPLA3 com esteatose grave (OR:11,02; IC95%1,48-82,09; p=0,04), fibrose avançada no tempo inicial (p=0,005) e progressão da fibrose (OR: 10,31; IC95%:1,06-99,59, p=0,04), esta última medida no fim do acompanhamento.[69] Jiménez-S et al. em estudo retrospectivo, avaliaram 187 pacientes com HCV por meio de elastografia hepática transitória durante um período médio de 47 meses e mostraram risco aumentado de progressão para fibrose avançada em pacientes com o genótipo GG (OR: 2,03; IC95% 1,01-4,06; p=0,045).[70]

Embora a maior parte dos trabalhos mostre a relação do PNPLA3 com a progressão da doença hepática pelo HCV, outros apresentam resultados divergentes. Nakamura et al. (2013), em uma população formada exclusivamente por japoneses (206 pacientes), não mostrou associação do polimorfismo com esteatose ou cirrose.[71] Huang CM et al. (2017) avaliaram

1080 pacientes asiáticos com HCV e observaram risco aumentado de esteatose para o alelo G em relação ao alelo C do PNPLA3 (OR:2,06; IC95% 1,46–2,88; p<0,001), além de aumento *borderline* da prevalência de esteatose hepática em pacientes com o genótipo GG *versus* CC (40,8% e 49,3%, respectivamente; p=0,059); no entanto, não encontraram associação significativa com fibrose.[72] Zampino et al. (2013) também não observaram relação significativa do polimorfismo com fibrose hepática.[73]

Nesse contexto, é importante atentar que a maioria dos trabalhos incluiu populações predominantemente caucasianas ou asiáticas, separadamente, excluindo grupos miscigenados da análise. No único estudo nacional publicado sobre o tema, Manchiero et al. (2017) avaliaram uma população de 290 brasileiros com HCV e observaram associação significativa do genótipo GG do PNPLA3 com esteatose hepática (OR: 2,16; IC95% 1,26-3,72; p=0,01) e fibrose avançada (OR: 2,64; IC95% 1,26-5,53; p=0,01)[74] A Tabela 1 resume sequencialmente os principais trabalhos publicados com o PNPLA3 em hepatite C crônica.

Estudos recentes têm observado outras associações de importância clínica entre o PNPLA3 e o HCV. Senkerikova et al. (2019), em uma população de 172 pacientes com genótipo 1b em lista de transplante, observaram que o alelo G do PNPLA3 aumentou o risco de transplante por insuficiência hepática crônica (CG + GG vs. CC; - OR:1,90; IC95% 1,017–3,472; p=0,045).[75] Mandorfer et al. (2018) avaliaram pacientes com hipertensão portal confirmada por medidas invasivas de gradiente venoso de pressão (372 pacientes com gradiente ≥ 6 mmHg) e observaram que o

genótipo GG não apresentou impacto em mortalidade no subgrupo com HCV, embora tenha sido associado a maior risco de descompensação hepática.[76] Dunn et al. (2019) incluíram 56 pacientes com cirrose descompensada (Child-Pugh B ou C) que foram submetidos a tratamento antiviral e atingiram RVS na 12ª semana; os autores avaliaram por critérios clínicos e laboratoriais todos os pacientes nas semanas 12, 24 e 48 após a RVS e observaram melhora mais lenta desses parâmetros em portadores dos genótipos GG e CG.[77]

Tabela 1 - Resumo dos principais estudos que avaliaram a influência do PNPLA3 – rs738409 na hepatite C crônica

	Amostra	**Etnia**	**Esteatose**	**Fibrose**	**Cirrose**
Cai et al., 2011[66]	626	Caucasianos	**p<0,001**	**-**	**-**
Valenti et al., 2011[67]	325	Caucasianos	-	**p<0,002**	**p<0,002**
Trépo et al., 2011[65]	537	Caucasianos	**p=0,034**	**p<0,002**	
Zampino et al, 2013[73]	166	Caucasianos	**p=0,0047**	n.s.	**-**
Nakamura et al, 2013[71]	206	Asiáticos	n.s.	-	n.s.
Huang CF et al, 2015[62]	1077	Asiáticos	**-**	**p=0,04**	-
Yasui et al. 2015[78]	276	Asiáticos	**p<0,003**	**p<0,03**	-
Huang CM et al., 2017[72]	1080	Asiáticos	**p=<0,001**	n.s.	-
Kupcinskas et al. 2017[68]	471	Caucasianos	**-**	**p=0,01**	**p=0,005**
Manchiero et al., 2017[74]	290	Miscigenada	**p=0,01**	**p=0,01**	
Jiménez-S et al., 2018[70]	187	n.i.	**-**	**p=0,045**	**-**
Crisan et al., 2019 [69]	98	Caucasianos	**p=0,04**	**p=0,04**	**-**

Abreviações: n.s: sem significância estatística; n.i.: não informado na publicação.

1.2.5- PNPLA3 e outras hepatopatias crônicas

No contexto das doenças hepáticas não hepatite C, não DHGNA, o papel do PNPLA3 segue controverso.[41] Para a doença alcoólica, no entanto, as evidências apontam para associação positiva com cirrose e CHC.[79],[80]

Na hepatite B crônica, a variante I148M parece predispor isoladamente à esteatose e, quando combinada com sobrepeso ou uso de álcool, correlaciona-se também com fibrose hepática avançada.[81] Estudo chinês avaliou quatro polimorfismos do PNPLA3 (rs738409, rs3747206, rs4823173 e rs2072906) em 51 pacientes com HBV, 57 pacientes com hepatite B crônica associada a DHGNA e 47 controles saudáveis. O alelo G do rs738409, o alelo T do rs3747206 e o alelo G do rs2072906 conferiram maior risco de DHGNA. Dentro do grupo com DHGNA de base, a coexistência com o HBV conferiu susceptibilidade aumentada a esteatohepatite e fibrose significativa.[22]

Na hemocromatose hereditária, Valenti et al. (2012) demonstraram associação da variante I148M com maiores níveis de enzimas hepáticas ao diagnóstico (independentemente do IMC ou gravidade da sobrecarga de ferro), e também correlação com esteatose e fibrose.[82] Em colangite esclerosante primária, a variante rs738409 (I148M) do gene PNPLA3 esteve associada à redução da sobrevida em pacientes masculinos com estenose biliar dominante e necessidade de intervenção.[83] Para a Doença de Wilson, Stättermayer et al. (2015) avaliaram 98 pacientes caucasianos com diagnóstico definido da doença e observaram que o alelo G do PNPLA3 e a idade menor do que 18 anos estão associados a esteatose moderada / grave na análise multivariada, independente do conteúdo hepático de cobre.[84]

1.3- O GENE TM6SF2

O gene *Transmembrane 6 superfamily member 2* (TM6SF2) está localizado no cromossomo 19 e codifica uma proteína composta por 351 aminoácidos, a qual está fortemente relacionada ao metabolismo lipídico hepático. Estudos experimentais mostraram que a proteína TM6SF2 regula o metabolismo hepático de gorduras através do transporte intracelular, lipidação e secreção do VLDL pelos hepatócitos. Assim, o genótipo selvagem CC do TM6SF2 promove a excreção hepática de lipoproteínas ricas em TG, protegendo o fígado contra o acúmulo de gordura, ao mesmo tempo que eleva os níveis de lípides circulantes e leva a um aumento teórico do risco cardiovascular. [43, 85-87] Modelos experimentais sugerem que diferenças da expressão gênica do TM6SF2 podem interferir nas vias do metabolismo do colesterol, ácidos graxos e glicose, com potenciais consequências deletérias para o fígado e sistema cardiovascular.[88, 89]

Kozlitina et al. (2014) demonstraram, através de técnica diferenciada de GWAS, uma variante genética (E167K) caracterizada pela substituição do glutamato pela lisina no códon 167 da proteína (rs58542926 c.449C>T, p.Glu167Lys).[43] Essa variante está associada à redução da ação da proteína TM6SF2 nos hepatócitos, com diminuição da secreção de VLDL e maior compartimentalização hepática de lipídios, ao mesmo tempo que reduz os níveis de lipoproteínas circulantes. Esse processo leva ao desenvolvimento de esteatose, além de desencadear inflamação e fibrogênese hepáticas através de mecanismos ainda não completamente esclarecidos.[90-92]

Considerado o seu duplo papel, a avaliação do genótipo do TM6SF2 apresenta uma potencial utilidade como ferramenta para estratificação de risco, identificando pacientes com maior predisposição a complicações hepáticas ou cardiovasculares da síndrome metabólica. A Figura 2 ilustra os principais mecanismos através dos quais o TM6SF2 e sua variante E167K influenciam o metabolismo hepático de gorduras e o sistema cardiovascular.

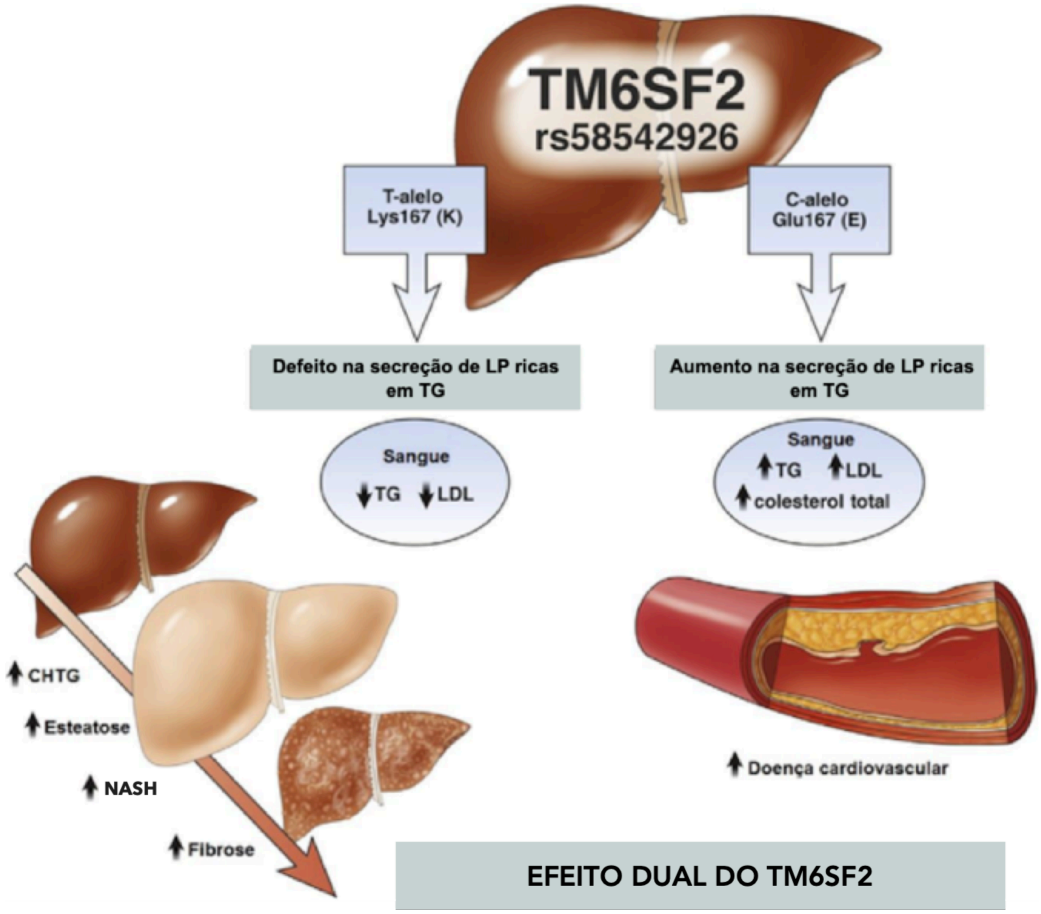

Figura 3. Modelo esquemático da influência do TM6SF2 no desenvolvimento de DHGNA e risco cardiovascular. A forma selvagem do TM6SF2 influencia a exportação de VLDL do fígado para o sangue, o que resulta em aumento sérico de lipídios e maior risco cardiovascular, porém com diminuição do risco de esteatose hepática. A sua variante E167K, por sua vez, desempenha o papel oposto, predispondo ao acúmulo hepático de gorduras, enquanto diminui a secreção hepática de lipoproteínas e possivelmente reduz a ocorrência de eventos cardiovasculares. **Abreviaturas**: TM6SF2, *Transmembrane 6 Superfamily Member 2*; VLDL, very low-density lipoprotein; TG, triglicerídeos; LP, lipoproteínas; LDL, *low-density lipoprotein*; CHTG, conteúdo hepático de triglicerídeos; NASH, esteatohepatite não alcoólica. ***Adaptado de Kahali B, et al.***[93]

1.3.1- TM6SF2 e a DHGNA

Estudo europeu publicado por Dongiovanni et al. (2015) observou que os portadores da variante E167K apresentaram esteatose mais grave, maior frequência de NASH (OR: 1,84; IC95%: 1,23-2,79; p<0,05), além de maior percentual de fibrose avançada (OR: 2,08; IC95%: 1,20-3,55; p<0,05). Tais associações foram mantidas mesmo após ajustes por idade, sexo, IMC, glicemia e coexistência da variante I148M do PNPLA3. O grupo com este polimorfismo mostrou ainda maiores níveis de ALT, menores níveis séricos de lipídios (p<0.05), menor frequência de aterosclerose das carótidas (OR: 0,49; 95% CI: 0,25-0,94) e menor prevalência de eventos cardiovasculares (*hazard ratio*: 0.61; IC95% 0.39-0.95).[94]

Estudo independente que incluiu duas grandes coortes com 1.740 caucasianos europeus com DHGNA mostrou que portadores do genótipo TT apresentaram aumento do conteúdo hepático de TG, além de maior risco de fibrose avançada e cirrose.[95] Achados semelhantes foram descritos em outro estudo que incluiu 957 crianças obesas e adolescentes e mostrou maior prevalência de fibrose (p=0,04) e mais atividade inflamatória (p=0,05) em pacientes portadores do alelo T em relação aos homozigotos para o alelo selvagem.[96]

Meta-análise publicada por Pirola et al. (2014) confirmou o papel duplo e divergente do TM6SF2 E167K (rs58542926 C/T) em relação à doença cardiovascular e risco de DHGNA. Estimativas combinadas de efeitos aleatórios em 101.326 pessoas mostraram que portadores do alelo T, em comparação com indivíduos homozigotos para o alelo ancestral C, estão

protegidos contra evento cardiovascular (ECV), enquanto apresentaram níveis mais baixos de colesterol total, LDL e TG. Em contraste, mostraram maior frequência de DHGNA (OR: 2,13; IC95% 1,36-3,30; p=0,0009; n=3,273) e conteúdo hepático de gordura cerca de 2% maior quando comparados com homozigotos CC (n =3.413).[97] Holmen et al. (2014) observaram que o alelo C selvagem, quando comparado ao T, foi associado ao aumento do risco de ECV, inclusive de infarto agudo do miocárdio, além de níveis séricos mais elevados de colesterol total.[89]

1.3.2- TM6SF2 e a hepatite C crônica

Acredita-se que a interação entre as glicoproteínas do HCV e o metabolismo lipídico do hospedeiro possa potencializar o efeito do polimorfismo do TM6SF2, com prováveis consequências deletérias ao fígado.

Em estudo com 148 italianos com HCV virgens de tratamento, Coppola et al. (2015) demonstraram que existe relação do genótipo do TM6SF2 com a presença de esteatose hepática.[98] Este foi o primeiro estudo que observou a influência da variante E167K de forma significante e independente do PNPLA3 em pacientes com HCV. Neste mesmo trabalho, os autores encontraram sinergismo entre os polimorfismos do PNPLA3 e TM6SF2, observando maiores taxas de esteatose avançada em pacientes com os dois polimorfismos combinados em relação a cada um deles isoladamente (p=0,04).[98]

Em outra publicação realizada com 815 italianos portadores do HCV virgens de tratamento, Milano et al. (2015) encontraram a variante E167K do

TM6SF2 em 69 deles (9%). Esta variante foi associada com maior gravidade da esteatose (p=0,031) e aumento da atividade necroinflamatória (p=0,037) em indivíduos infectados sem o genótipo 3. Na análise por regressão logística multivariada, o polimorfismo também foi associada de forma independente com cirrose (p=0,01) e mostrou uma tendência positiva para fibrose significativa (p=0,058).[90]

Eslam et al. (2016) em coorte europeia com 2.023 pacientes com HCV, observou que os genótipos TT/CT do TM6SF2 são preditores independentes de risco de esteatose (graus 2 e 3; p=0,01), fibrose significativa (≥ F2; p=0,02) e cirrose (p=0,04).[99]

Tabela 2 - Resumo dos principais estudos que avaliaram a influência do TM6SF2 – rs58542926 na hepatite C crônica

	Amostra	Etnia	Esteatose (G1-3)	Fibrose (≥F2)	Cirrose
Coppola et al., 2015[98]	148	Caucasiana	**p=0,037**	n.s.	-
Milano et al., 2015[90]	815	Caucasiana	**p=0,04***	p=0,058	**p=0,01**
Petta et al., 2016[100]	294	Caucasiana	n.s.	**p=0,40**	-
Eslam et al., 2016[99]	2023	Caucasiana	**p=0,01**	**p=0,02**	**p=0,04**
Bacevice et al., 2019[101]	120	Caucasiana	-	-	n.s.

Abreviações: n.s: sem significância estatística

Apesar da experiência crescente com os polimorfismos dos genes TM6SF2 e PNPLA3 em doenças hepáticas crônicas, o seu papel no espectro da doença hepática pelo HCV permanece controverso. Além disso, vimos que a grande maioria dos estudos publicados até o momento incluiu populações

predominantemente europeias ou asiáticas, reforçando a necessidade de se estudar populações miscigenadas como a brasileira.

Mesmo na era dos DAAs com elevadas taxas de RVS, a identificação dos polimorfismos genéticos e de outras características metabólicas dos portadores do HCV poderá ser útil para a estratificação de risco, influenciando estratégias de priorização de início de terapia e planejamento de seguimento ambulatorial.[102, 103] Além disso, os pacientes com os genótipos de risco poderiam eventualmente manter o risco aumentado de progressão da doença hepática mesmo após a erradicação viral, demandando atenção e vigilância individualizadas.[104, 105]

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Determinar as frequências dos polimorfismos dos genes *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) e *Transmembrane 6 Superfamily Member 2* (TM6SF2) e estimar a associação desses polimorfismos com esteatose e fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento antiviral.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar a relação dos polimorfismos do PNPLA3 e do TM6SF2 com fatores da síndrome metabólica em pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento antiviral.

3. MÉTODOS

Este estudo transversal avaliou pacientes atendidos nos ambulatórios de Hepatologia e de Infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) entre os anos de 2014 e 2016, todos portadores de hepatite C crônica sem tratamento antiviral prévio até o momento da biópsia hepática. Um segundo grupo de indivíduos saudáveis voluntários, sem hepatite B, C ou anormalidade das enzimas hepáticas foi utilizado para análise comparativa da frequência dos polimorfismos dos genes PNPLA3 e TM6SF2.

A partir dos dados obtidos em prontuário, foram registradas as características demográficas, epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de cada paciente. Os polimorfismos dos genes PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G) e TM6SF2 (rs58542926 c.449C>T) foram pesquisados em todos os participantes do estudo.

Foi avaliado um total de 365 pacientes portadores de hepatite C crônica após preencher adequadamente os critérios de inclusão e não apresentar nenhum critério de exclusão. O grupo de comparação foi formado por 134 indivíduos saudáveis voluntários.

Os dados clínicos foram registrados em prontuário durante consulta médica por hepatologista ou infectologista em atendimento de rotina.

3.1 Critérios de inclusão:

a. Pacientes acima de 18 anos com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica (anticorpo anti-HCV por ELISA associada à detecção do RNA viral quantitativo no sangue por pelo menos seis meses).

b. Pacientes com biópsia hepática realizada antes de qualquer tratamento antiviral direcionado contra o HCV.

3.2 Critérios de exclusão:

a. Pacientes com outras hepatopatias crônicas não hepatite C;

b. Pacientes com coinfecção por HIV;

c. Pacientes com antecedente de transplante hepático;

d. Pacientes com história de consumo abusivo de álcool (média de consumo acima de 20 g de álcool por dia);

e. Pacientes que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.3 Variáveis e definições:

3.3.1 Características demográficas e antropométricas

Idade, gênero, peso, altura e índice de massa corpórea (calculada pela relação entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros).

3.3.2 Antecedentes patológicos e hábitos de vida

DM2, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, obesidade e hipotireoidismo.

3.3.3 Variáveis laboratoriais

A avaliação laboratorial incluiu: hemograma completo, glicemia de jejum, insulina de jejum, colesterol total e frações, TG, ALT, AST, fosfatase alcalina (FA) e gamaglutamil transferase (GGT). Todos os exames foram coletados após 12 horas de jejum.

Os exames laboratoriais bioquímicos foram coletados com uma diferença de até dois meses da data da biópsia hepática.

3.3.4 Definição de resistência insulínica e síndrome metabólica

A resistência à insulina foi estimada por meio do *Homeostatic Model of Assessment* (HOMA): 22,5 x insulina em jejum (mU/mL) x glicose (mmol/L).[106] HOMA ≥ 2,5 foi utilizado como ponto de corte para definir resistência insulínica.[107]

De acordo com as recomendações do *Adult Treatment Panel III Report*, o diagnóstico de SM foi baseado na presença de três ou mais dos seguintes critérios: glicemia de jejum ≥ 110 mg/dL, TG ≥ 150 mg/dL, lipoproteína de alta densidade (HDL) < 40 mg/dL em homens ou < 50 mg/dL em mulheres; pressão arterial sistólica ≥ 130 mmHg e/ou diastólica ≥ 85 mmHg e obesidade abdominal.[108]

3.3.5 Definição de hepatite C crônica

Documentação de infecção pelo vírus da hepatite C há pelo menos 6 meses (anticorpo anti-HCV por ELISA) associada à detecção do RNA viral quantitativo no sangue.

Os níveis séricos de HCV-RNA foram avaliados com PCR em tempo real através do teste *Amplicor HCV Monitor 2.0* (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ, EUA, limite de detecção: 50 IU/ml). A genotipagem viral foi realizada a partir do teste *Versant® HCV Genotype 2.0 LiPA* (Imunogenetics,

Ghent, Bélgica). Ambos seguiram os protocolos recomendados pelos respectivos fabricantes.

3.3.6 Histologia hepática

O estadiamento da doença hepática foi realizado através de avaliação histopatológica. Apenas biópsias com amostras acima de 12 mm e contendo pelo menos dez espaços-porta foram consideradas elegíveis para o estudo. As amostras foram avaliadas de maneira cega pela de equipe de patologia do HCFMUSP.

Foi utilizada a classificação METAVIR para a avaliação do grau de fibrose e da atividade necroinflamatória hepáticas. A fibrose foi classificada da seguinte forma: Fibrose: F0 (ausente), F1 (fibrose portal sem septos), F2 (fibrose portal com raros septos), F3 (numerosos septos sem cirrose) e F4 (cirrose). A atividade necroinflamatória corresponde à quantidade de células mononucleares observadas em torno dos espaços-porta e parênquima hepáticos e foi classificada em quatro graus: A0 (ausente), A1 (atividade leve), A2 (atividade moderada) e A3 (atividade intensa).[109]

A tabela 3 apresenta a correspondência aproximada da classificação METAVIR com outras classificações anatomopatológicas classicamente utilizadas no estadiamento e graduação das hepatites virais crônicas.

A esteatose hepática foi evidenciada através de coloração com hematoxilina-eosina e graduada a partir da análise do percentual de hepatócitos da amostra com esteatose: Grau 0 (< 5%), Grau 1 (5 a 33%), Grau 2 (34 a 66%) e Grau 3 (acima de 66%).

Tabela 3. Correlação entre as classificações anatomopatológicas da hepatite C crônica

ALTERAÇÃO ARQUITETURAL (FIBROSE)		
METAVIR, 1994	SBP, 2000	ISHAK, 1995
0	0	0
1	1	1 ou 2
2	2	3
3	3	4 ou 5
4	4	6
ATIVIDADE INFLAMATÓRIA*		
METAVIR, 1994	SBP, 2000 e ISHAK, 1995	
A	**ATIVIDADE PERIPORTAL**	**ATIVIDADE PARENQUIMATOSA**
0	0 ou 1	0
1	0 ou 1	1 ou 2
1	2	0 – 1
2	2	2
2	3	0 – 2
3	2	3 – 4
3	3	3 – 4
3	4	0 – 4

* Correspondendo à atividade periportal para o SBP e o ISHAK, e um misto de periportal e lobular para o METAVIR; no METAVIR, o escore de atividade vai até o grau 3, enquanto no ISHAK e no SBP vai até grau 4.

Adaptado de Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para a Hepatite Viral Crônica C e Coinfecções 2019(36)

3.4 Avaliação dos polimorfismos nos genes PNPLA3 e TM6SF2

Foram coletados 15 mL de sangue periférico de cada paciente para a extração do DNA genômico a partir de leucócitos e posterior genotipagem. Foram avaliados os polimorfismos nos genes PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p. I148M) e TM6SF2 (rs58542926 c.449C>T, p.Glu167Lys).

3.4.1 Extração do DNA genômico

Em um tubo graduado, foram acrescentados 15 mL de Tris-EDTA - Sigma Aldrich, St Louis, EUA para cada 5 mL de sangue total. O tubo foi homogeneizado manualmente e então centrifugado a 1.500g durante 5 min. O

sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi lavado com 15 mL de Tris-EDTA até sua dissolução total. Após a lavagem, foi realizada nova centrifugação e o sobrenadante desprezado. Esse processo é repetido quatro vezes, até que o precipitado assuma coloração esbranquiçada. Em seguida, são adicionados ao precipitado: 03 mL de Tampão (25mM de EDTA e 75 mM de NaCl), 200 µL de sódio dodecil sulfato 10% (Sigma) e 100 µL de Proteinase K (Sigma).

Essa solução foi incubada por 12 horas a 37ºC e, após esse intervalo, adicionado 1 mL de NaCl 5M. Após agitação vigorosa durante 30 min, o tubo foi centrifugado a 2.500g durante 15 min, o precipitado desprezado e o sobrenadante recolhido em novo tubo. Em seguida, 10 mL de etanol absoluto gelado foram adicionados ao tubo, com posterior homogeneização por inversão até o aparecimento de um precipitado fibrilar, que foi então transferido para novo tubo tipo Eppendorf 1,5 mL e seco em temperatura ambiente durante 30 min. O precipitado foi ressuspenso em 50 – 200 µL H2O miliQ estéril e incubado a 37ºC durante 15 min. A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria (*GeneQuant DNA/RNA Calculator, Pharmacia, LKC Biotechnology*, Uppsala, Suécia). O DNA assim obtido foi armazenado à temperatura de - 20 ºC.

3.4.2 Genotipagem dos polimorfismos do gene PNPLA3 (rs738409 c.444 C>G, p.Ile148Met - I148M)

Os polimorfismos foram genotipados por PCR em tempo real (*TaqMan*), com a utilização de iniciadores específicos e sondas marcadas,

que reconhecem cada um dos genótipos possíveis do polimorfismo. A equipe envolvida com a análise não conhecia as características clínicas e bioquímicas dos pacientes.

A PCR foi realizada com a utilização do estojo comercial StepOne Plus, Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA), conforme as recomendações do fabricante. Após a reação de PCR foi realizada discriminação alélica medindo a fluorescência alelo-específica no sistema de detecção Opticon 2 (MJ Reserch, Walyham, MA, Estados Unidos). Amostras aleatórias foram confirmadas por genotipagem direta para avaliar resultados concordantes. Foram realizados controles de qualidade para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

3.4.3 Genotipagem dos polimorfismos no gene TM6SF2 (rs58542926 c.449C>T, p.Glu167Lys – E167K)

Esses polimorfismos foram genotipados por PCR em tempo real TaqMan (Applied Biosystems Inc., EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras controle dos genótipos conhecidos foram incluídas em cada placa. A genotipagem também foi realizada por pessoal não ciente dos dados dos pacientes.

3.5 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram registrados em tabela via software Windows Excel 2016. O pacote do software SAS (*Statistical Analysis System*) para Windows (versão 9.4, SAS Institute Inc., 2002–2008, Cary, NC, EUA) foi

utilizado para as análises estatísticas realizadas por equipe de estatísticos biomédicos.

Os dois polimorfismos foram avaliados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos do estudo.[110] O equilíbrio de Hardy-Weinberg entre a distribuição esperada e a observada dos genótipos de cada gene foi estimada pelo teste do Qui-quadrado. Para a análise do efeito do gene TM6SF2 na histologia hepática, foi utilizado o modelo de herança dominante, comparando portadores do alelo T com pacientes que não tenham nenhuma cópia desse alelo (genótipo CT+TT vs. CC). Para o PNPLA3, a análise estatística considerou o modelo dominante (CG+GG vs. CC), porém incluiu ainda a análise de cada alelo separadamente (modelo codominante).

A análise descritiva dos dados qualitativos foi feita por meio de proporções, com intervalo de confiança de 95%. Para os dados quantitativos foram construídas tabelas descritivas com valores de média, mediana, desvio padrão (DP) e valores mínimo e máximo de cada variável numérica avaliada.

Para confirmação das associações foram realizados testes de hipóteses a partir de um nível de significância de 5% ($p<0,05$). Para comparação das variáveis categóricas, utilizamos os testes de Qui-quadrado e o teste exato de Fischer, quando necessário. Para as variáveis numéricas foram utilizados os testes de Mann-whitney e Kruskal-wallis.

Os polimorfismos do PNPLA3 rs738409 C>G e do TM6SF2 rs58542926 C>T foram comparados dentro do grupo com HCV quanto à esteatose, fibrose e grau de atividade necroinflamatória hepática. Para fins de análise estatística, os pacientes foram divididos em duas categorias para

cada parâmetro histológico avaliado: fibrose ausente ou inicial (F0-1) e fibrose significativa (F2-4); esteatose ausente (grau 0) ou presente (graus 1 ao 3) e atividade necroinflamatória ausente ou leve (A0-1) *versus* atividade moderada a intensa (A2-3).

Foram utilizados os métodos de análise por regressão logística para avaliar a influência de cada variável independente (incluindo cada genótipo avaliado) na chance de ocorrer a alteração da histologia, seja inflamação, fibrose ou esteatose. Foram realizadas múltiplas análises univariadas e multivariadas. A análise multivariada utilizou os critérios de seleção passo a passo (*stepwise*) para determinar o efeito independente de cada variável.

3.6 Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FMUSP (número 2.676.105; Anexo 7.1). O protocolo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki 1975.

O TCLE (Anexo 7.2) foi fornecido aos pacientes, com leitura, compreensão e assinatura do documento previamente à participação no estudo.

4. RESULTADOS

Foram incluídos 365 pacientes com hepatite C crônica e 134 indivíduos saudáveis. A maioria dos pacientes era do sexo feminino, apresentava sobrepeso e a média de idade foi 54,54 (± 12,7 anos). A principal etnia autodefinida foi branca (76,61%), e 23,18% deles preenchiam critérios para SM. O genótipo viral mais frequente foi o tipo 1 (79,39%), seguido pelo genótipo 3 (17,85%). As principais características dos pacientes incluídos estão detalhadas na Tabela 4.

Tabela 4. Características demográficas, clínicas e bioquímicas dos pacientes com HCV

	Pacientes HCV (n= 365) % (n) ou média ± DP
Idade (anos)	54,54 ± 12,7
Homens / Mulheres (n)	44,93% (164) / 55,07% (201)
DM2 (n)	23,12% (83/359)
Dislipidemia (n)	20,11% (72/358)
HAS (n)	43,45% (156/359)
Obesidade (IMC ≥ 30)	29,44% (106/360)
IMC	27,57 ± 5.02
Síndrome Metabólica (n)	23,18% (83/358)
Hipotireoidismo (n)	17,27% (62/359)
ECV prévio (n)	5,01% (17/359)
Genótipo HCV (n)	
1	79,39% (289/364)
2	2,19% (8/364)
3	17,85% (65/364)
4	0,54% (2/364)
HOMA-IR	3,18 ± 4.24
AST (U/L)	63,36 ± 50.84
ALT (U/L)	68,84 ± 51.27
Fosfatase alcalina (U/L)	83 ± 34.62
GGT (U/L)	102,07 ± 110.32
Creatinina (mg/dL)	0,89 ± 0.6
Colesterol total (mg/dL)	157,25 ± 36.06
HDL (mg/dL)	52,11 ± 16.31
LDL (mg/dL)	85,01± 31.22
Triglicerídeos (mg/dL)	101,81 ± 52.5

Abreviações: ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: Índice de massa corpórea; ECV: evento cardiovascular; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade; GGT: gamaglutamil transferase; HCV: vírus da hepatite C e DP: desvio padrão.

Quando comparados indivíduos saudáveis e pacientes com hepatite C, não houve diferença do gênero (p=0,5739), no entanto, os participantes do grupo comparação eram mais jovens do que aqueles com HCV (média de idade de 42 ± 12,12 *vs* 54,54 ± 12,7 anos; p<0,0001).

A partir da análise histopatológica dos pacientes com HCV, observou-se a presença de esteatose (graus 1 - 3) em 55,09% dos pacientes incluídos. Todas as faixas de fibrose foram representadas na amostra, com 64,55% dos pacientes com fibrose significativa (F2 - 4), 46,42% com fibrose avançada (F3 - 4) e 30,49% deles com cirrose (F4). Em relação à atividade necroinflamatória, 54% deles apresentavam atividade moderada a intensa. A Tabela 5 mostra a distribuição dos pacientes em relação às características do estudo anatomopatológico hepático.

Tabela 5. Características histopatológicas dos pacientes com HCV

Histologia hepática	Pacientes HCV (n= 365) % (n)
Fibrose (n=364)	
F0	7,42% (27)
F1	28,02% (102)
F2	18,13% (66)
F3	15,93% (58)
F4	30,49% (111)
Inflamação (n= 300)	
A0	5,67% (17)
A1	40,33% (121)
A2	36,67% (110)
A3	17,33% (52)
Esteatose (n=354)	
0	44,92% (159)
1	32,49% (115)
2	16,67% (59)
3	5,93% (21)

Abreviações: HCV: vírus da hepatite C e DP: desvio padrão.

Todos os grupos estudados estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O grupo HCV do TM6SF2 com χ2 = 0,5654 (p=0,452); o seu controle com χ2 = 0,1618 (p=0,688). Para o PNPLA3, o grupo HCV apresentou χ2 = 0,1691 (p=0,681) e o controle χ2 = 0,0967 (p=0,756). A tabela 6 mostra a distribuição dos genótipos dos genes TM6SF2 e PNPLA3 entre os grupos e o seu respectivo teste do equilíbrio de Hardy–Weinberg.

Tabela 6. Testes do equilíbrio de Hardy–Weinberg dos genótipos do PNPLA3 e TM6SF2

Genótipo	Valor encontrado	Valor esperado	χ2	Valor de p
PACIENTES COM HCV				
PNPLA3				
CC	187	188,58		
CG	150	146,84	0,1691	0,681
GG	27	28,58		
TM6SF2				
CC	322	321,22		
CT	38	39,59	0,5654	0,452
TT	2	1,22		
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS				
PNPLA3				
CC	66	65,24		
CG	55	56,52	0,0967	0,756
GG	13	12,24		
TM6SF2				
CC	125	125,15		
CT	9	8,7	0,1618	0,688
TT	0	0,15		

Abreviações: χ2: Teste do Qui-quadrado; HCV: hepatite C crônica. * **p < 0,05**.

Nos indivíduos saudáveis, as frequências dos genótipos CC e CT+TT do TM6SF2 foram 93,28% e 6,72%, respectivamente; estas foram 88,95% e 11,05% dentre os pacientes com HCV. Em relação aos polimorfismos do PNPLA3, as frequências do CC e CG+GG entre os saudáveis foram 49,25% e

50,74%, respectivamente; estas foram de 51,37% e 48,63% em pacientes com HCV (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência dos polimorfismos PNPLA3C>G e TM6SF2C>T entre indivíduos saudáveis e pacientes com HCV

		Frequência do genótipo % (n)			Total %
		CC	**CG**	**GG**	
PNPLA3	Saudáveis (n=134)	49,25 (66)	41,04 (55)	9,7 (13)	100
	HCV (n=365)	51,37 (187)	41,21 (150)	7,42 (27)	100
		CC	**CT**	**TT**	
TM6SF2	Saudáveis (n=134)	93,28 (125)	6,72 (9)	0	100
	HCV (n=365)	88,95 (322)	10,5 (38)	0,55 (2)	100

Abreviações: HCV: vírus da hepatite C

Analisando as associações dos polimorfismos do PNPLA3 em pacientes com HCV, nós pudemos encontrar que sujeitos com o genótipo GG tiveram menor IMC do que aqueles CG e CC (25,19 ± 3,7 *vs* 27,9 ± 5,24 *vs* 27,67 ± 4,94, p=0,0469). Dentre os pacientes com os genótipos CG / GG, 24,32% apresentaram SM, significantemente menos frequente do que em pacientes com o genótipo CC, cuja frequência foi de 25,68% (p=0,0137). Nenhuma outra diferença foi observada com as demais variáveis clínicas, bioquímicas ou histológicas pesquisadas (ver Tabela 8).

Tabela 8. Características dos pacientes com HCV de acordo com os polimorfismos do PNPLA3 (n=364)

	CC % / (n) ou média ± DP	**CG**	**GG**	**Valor de p**
Idade (anos)	53.75 ± 12.9	55.94 ± 12.52	52.04 ± 12.03	0.1912
Homens / Mulheres (n)	48,66%(91)/51,34%(96)	42%(63)/58%(87)	33.33%(9)/ 66.67%(18)	0.2187
Diabetes tipo 2 (n)	23,37% (43)	25,68% (38)	7,69% (2)	0.1338
Dislipidemia (n)	21,2% (39)	21,09% (31)	3,85% (1)	0,1038
HAS (n)	42,93% (79)	45,27% (67)	38,36% (10)	0,7866
Obesidade (IMC≥30) (n)	30,81% (57)	30,41% (45)	15,38% (4)	0,2592
IMC	**27,67 ± 4,94**	**27,9 ± 5,24**	**25,19 ± 3.7**	**0,0469*(GG<CG/CC)**
Síndrome metabólica (n)	**25,68% (47)**	**24,32% (36)**	**0% (0)**	**0,0137**
Hipotireoidismo (n)	17,39% (32)	16,89% (25)	19,23% (5)	0,9580
HOMA-IR ≥ 2.5 (n)	51,87% (97)	55,33% (83)	44,44% (12)	0,5470
HOMA-IR	3,19 ± 4,65	3,33 ± 3,94	2,46 ± 2.71	0,2934
AST (U/L)	66,11 ± 59,4	59,62 ± 37,57	66,63 ± 51,98	0,9293
ALT (U/L)	71.82 ± 55.08	64,68 ± 43,82	73 ± 62,14	0,5056
Fosfatase alcalina (U/L)	84,61 ± 33,1	82,71 ± 38,26	73,26 ± 20,73	0,1968
GGT (U/L)	103,74 ± 115,94	104,09 ± 110,33	78,89 ± 62,5	0,7617
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,77	0,87 ± 0,35	0,88 ± 0,39	0,9568
Colesterol total (mg/dL)	157,32 ± 37,85	158,26 ± 35,08	151,96 ± 29,2	0,7520
HDL (mg/dL)	51,34 ± 16,01	52,32 ± 16,52	56,33 ± 17,43	0,4661
LDL (mg/dL)	85,21 ± 32,12	85,89 ± 30,46	79,22 ± 30,06	0,5419
Triglicerídeos (mg/dL)	104,16 ± 46,95	101,93 ± 60,93	86,7 ± 34,53	0,1174

Teste do Qui-quadrado, Teste exato de Fisher, Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. **Abreviações:** ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corpórea; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HCV: vírus da hepatite C; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade; GGT: gamaglutamil transferase; DP: desvio padrão. * **p<0.05**.

Por outro lado, analisando os polimorfismos do TM6SF2 em pacientes com HCV, o genótipo CC foi associado com idade mais avançada (p=0,0024), maior frequência de HAS (p=0,0327), obesidade (p=0,0309), SM (p=0,0141), e maiores níveis séricos de fosfatase alcalina (p=0,0413) e colesterol total (p=0,0360), em relação aos genótipos CT / TT. Em adição, a presença do alelo T do TM6SF2 foi associada com fibrose hepática significativa (F2 – F4; p=0,0443), como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9. Características dos pacientes com HCV de acordo com os polimorfismos do TM6SF2 (n=362)

	CC % / (n) ou média ± DP	**CT / TT**	**Valor de P**
Idade (anos)	**55.17 ± 12.66**	**48.88 ± 11.87**	**0.0024***
Homens / Mulheres (n)	44.1% (142) / 55.9% (180)	52.5% (21) / 47.5% (19)	0.3139
Diabetes tipo 2 (n)	24.37% (77)	15% (6)	0.1868
Dislipidemia (n)	21.59% (68)	10% (4)	0.0860
HAS (n)	**45.25% (143)**	**27.5% (11)**	**0.0327***
Obesidade (IMC ≥ 30) (n)	**31.55% (100)**	**15% (6)**	**0.0309***
IMC	27.7 ± 5.21	26.59 ± 3.24	0.2749
Síndrome metabólica (n)	**25.32% (80)**	**7.69% (3)**	**0.0141***
Hipotireoidismo (n)	17.41% (55)	17.5% (7)	0.9881
HOMA-IR ≥ 2.5 (n)	53.11% (171)	50% (20)	0.7106
HOMA-IR	3.26 ± 4.31	2.69 ± 3.86	0.4144
AST (U/L)	63.11 ± 51.51	60.65 ± 42.02	0.8977
ALT (U/L)	68.76 ± 52.21	68.33 ± 44.48	0.7601
Fosfatase alcalina (U/L)	**84.19 ± 35.34**	**74.05 ± 27.46**	**0.0413***
GGT (U/L)	104.16 ± 113.22	84.26 ± 83.48	0.2760
Creatinina (mg/dL)	0.87 ± 0.33	1.01 ± 1.57	0.0910
Colesterol total (mg/dL)	**158.24 ± 35.06**	**147.33 ± 42.32**	**0.0360***
HDL (mg/dL)	52.27 ± 16.12	49.67 ± 15.88	0.5160
LDL (mg/dL)	85.69 ± 30.67	79.31 ± 36.08	0.1175
Triglicerídeos (mg/dL)	103.05 ± 54.03	91.05 ± 37.1	0.2057

Teste de Qui-quadrado, Teste exato de Fisher, Mann-Whitney, e teste de Kruskal-Wallis. **Abreviações:** ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; HCV: vírus da hepatite C; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade; GGT: gamaglutamiltransferase; DP: desvido padrão. *** p value < 0,05**.

Do ponto de vista da histologia hepática, os nossos resultados não mostraram associação significante entre os polimorfismos dos genes PNPLA3 e TM6SF2 e a presença de esteatose e/ou atividade necroinflamatória moderada ou intensa. Além disso, nem os genótipos CG / GG, nem a presença do alelo G do PNPLA3 avaliada individualmente, mostraram associação com fibrose significativa. Curiosamente, o genótipo CT / TT do TM6SF2 mostrou relação positiva com fibrose hepática significativa (p=0,043; Tabela 10).

Tabela 10. Associação dos polimorfismos do PNPLA3 e TM6SF2 com a histologia hepática em pacientes com HCV

PNPLA3	CC % / (n)	CG	GG	Valor de P
Fibrose (n)				
0-1	35,29% (66)	35,33% (53)	37,04% (10)	0,9838
2-4	64,71% (121)	64,67% (97)	62,96% (17)	
Inflamação (n)				
0-1	44,23% (69)	46,61% (55)	52% (13)	0,7509
2-3	55,77% (87)	53,39% (63)	48% (12)	
Esteatose (n)				
0	48,66% (91)	41,22% (61)	33,33% (9)	0,1900
1-3	51,34% (96)	58,78% (87)	66,67% (18)	
PNPLA3	**C**	**G**		**Valor de P**
Fibrose (n)				
0-1	35,29% (66)	35,59% (63)		0,9525
2-4	64,71% (121)	64,41% (114)		
Inflamação (n)				
0-1	44,23% (69)	47,55% (68)		0,5647
2-3	55,77% (87)	52,45% (75)		
Esteatose (n)				
0	48,66% (91)	40% (70)		0,0974
1-3	51,34% (96)	60% (105)		
TM6SF2	**CC**	**CT / TT**		**Valor de P**
Fibrose (n)				
0-1	**33,85% (109)**	**50% (20)**		**0,0443***
2-4	**66,15% (213)**	**50% (20)**		
Inflamação (n)				
0-1	46,74% (122)	43,24% (16)		0,6895
2-3	53,26% (139)	56,76% (21)		
Esteatose (n)				
0	45,31% (145)	40% (16)		0,5241
1-3	54,69% (175)	60% (24)		

Teste Qui-quadrado/*teste exato de Fisher. **Abreviações:** DP: desvio padrão. * **p<0,05**.

Pela análise univariada por regressão logística, os seguintes fatores foram associados a risco aumentado de fibrose hepática significativa (F2 – F4; Tabela 11): idade mais avançada, DM2 / resistência insulínica, dislipidemia, HAS, SM, maiores níveis séricos de AST, ALT, fosfatase alcalina, GGT e menores níveis de colesterol total e LDL. Destacamos que o genótipo CT do TM6SF2 foi associado com chance 1,95 vezes maior de fibrose hepática significativa entre os pacientes com HCV do que o genótipo CC (OR: 1,953; IC95% 1,009-3,788; p=0,0471).

Em uma análise multivariada passo a passo, permaneceram relacionados à fibrose significativa: maior idade (OR:1,103; IC95%1,073-1,134; p<0,0001), menor nível de colesterol total (OR:1,026; IC95%1,016-1,036; p<0,0001), elevação de ALT (OR:1,028; IC95%1,017-1,038; p<0,0001) e de fosfatase alcalina (OR:1,019; IC95%1,006-1,032; p=0,0043; Tabela 11).

Tabela 11. Variáveis associadas com fibrose hepática significativa (F2-F4) em pacientes com HCV (n=365).

	METAVIR F0-1	METAVIR F2-4	ANÁLISE UNIVARIADA			ANÁLISE MULTIVARIADA		
			OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
Idade (anos)	**47.66 ± 12.02**	**58.30 ± 11.44**	**1,075**	**1.054–1,097**	**<,0001**	**1,103**	**1,073–1,134**	**<,0001**
Homens / Mulheres (n)	47.29% (61)/ 52.71% (68)	56.36%(133)/ 43.64%(103)	1,158	0.753–1,782	0,5037			
Diabetes tipo 2 (n)	**13.49% (17)**	**28.33% (66)**	**2,532**	**1.412–4,545**	**0,0018**			
Dislipidemia (n)	**12.70% (16)**	**24.14% (56)**	**2,188**	**1.195–4,000**	**0,0112**			
HAS (n)	**26.98% (34)**	**52.36% (122)**	**2,976**	**1.859–4,762**	**<,0001**			
Obesidade (n)	28.35% (36)	30.04% (70)	1,086	0.674–1,748	0,7358			
S. Metabólica (n)	**14.40% (18)**	**27.90% (65)**	**2,299**	**1.294–4,082**	**0,0046**			
Hipotireoidismo (n)	11.90% (15)	20.17% (47)	1,869	0.999–3,497	0,0504			
Resistência insulínica	**43.41% (56)**	**57.63% (136)**	**1,773**	**1.149–2,732**	**0,0096**			
AST (U/L)	**42.57 ± 28.13**	**74.64 ± 56.59**	**1,025**	**1.016–1,034**	**<,0001**			
ALT (U/L)	**45.97 ± 28.02**	**81.25 ± 56.54**	**1,025**	**1.017–1,033**	**<,0001**	**1,028**	**1,017-1,038**	**<,0001**
Fosfatase alcalina (U/L)	**69.07 ± 20.45**	**90.52 ± 38.23**	**1,029**	**1.018–1,040**	**<,0001**	**1,019**	**1,006-1,032**	**0,0043**
GGT (U/L)	**69.97 ± 72.57**	**119.56±122.8**	**1,007**	**1.003–1,010**	**<,0001**			
Creatinina (mg/dL)	0.86 ± 0.26	0.90 ± 0.72	1,183	0.720–1,9[43]	0,5065			
Colesterol total(mg/dL)	**166.84±35.53**	**152.03±35.33**	**0,988**	**0.982–0,995**	**0,0002**	**0,975**	**0,965-0,984**	**<,0001**
HDL (mg/dL)	53.33 ± 15.76	51.45 ± 16.60	0,993	0.980–1,006	0,2949			
LDL (mg/dL)	**93 ± 32.99**	**80.64 ± 29.36**	**0,987**	**0.980–0,994**	**0,0004**			
Triglicerídeos (mg/dL)	107.3 ± 54.03	98.80 ± 42.18	0,997	0.993–1,001	0.1454			
PNPLA3 Alelo C/G (n)	51.16% (66) / 48.84% (63)	51.49%(121) /48.51%(114)	1,013	0.659–1,557	0.9524			
PNPLA3 CC / GG (n)	51,16%(66)/ 7,75%(10)	51,16%(66) / 7,23%(17)	1,078	0,467–2.490	0,9838			
PNPLA3 CG / GG (n)	41,09%(53) / 7,75%(10)	41,09%(53) / 7,23%(17)	1,077	0,460–2,518				
TM6SF2 CT / CC (n)	**15.50% (20) / 84.5% (109)**	**8.58% (20) / 91.42% (213)**	**1,953**	**1,009–3,788**	**0.0471***			

Regressão logística – análise univariada e multivariada. **Abreviações:** ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; IC: intervalo de confiança; GGT: gamaglutamiltransferase; HCV: vírus da hepatite C; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade; OR: odds ratio; DP: desvio padrão. ***p<0,05**.

O genótipo CT do TM6SF2 não foi associado à esteatose hepática (OR: 1,243; IC95% 0,636-2,428; p=0,5246 - Tabela 12) ou atividade inflamatória hepática moderada ou intensa em pacientes com HCV (OR: 1,152; IC95% 0,575-2,307; p=0,6896 - Tabela 13). O mesmo também não foi observado com o alelo G do PNPLA3 avaliado separadamente em relação à esteatose hepática e à atividade inflamatória moderada ou intensa (OR: 1,422; IC95% 0,937-2,155; p=0,0979 e OR: 1,143; IC95% 0,725-1,803; p=0,5648, respectivamente tabelas 12 e 13).

No entanto, a análise univariada revelou alguns fatores associados significantemente com a presença da esteatose, dentre eles DM2, dislipidemia, HAS, obesidade e SM, além das elevações séricas dos níveis de AST, ALT, GGT e TG (valores das associações estão detalhados na Tabela 12). Para a atividade necroinflamatória moderada a intensa, por sua vez, estiveram associados resistência insulínica e aumento dos valores de AST, ALT, FA e HDL (resultados descritos na Tabela 13).

Em uma análise multivariada por regressão logística passo a passo, permaneceram associados de forma independente à presença de esteatose hepática: resistência insulínica (OR: 1,720; IC95% 1,070-2,756; p=0,0252,), SM (OR: 2,227, IC95% 1,217–4,00; p=0,0034) e o nível sérico de GGT (OR: 1,003; IC95% 1,000–1,006; p=0,0134). Em relação à atividade necroinflamatória moderada a intensa, foram associados idade (OR: 1,030; IC95% 1,010-1,050; p=0,0027) e níveis séricos de HDL (OR: 0,9979; IC95% 0,964-0,994; p=0,0059) e AST (OR: 1,007; IC95% 1,001-1,012; p=0,0273).

Tabela 12. Variáveis associadas com a presença de esteatose hepática em pacientes com HCV (n=363)

	ESTEATOSE Grau 0	ESTEATOSE Graus 1-3	ANÁLISE UNIVARIADA			ANÁLISE MULTIVARIADA		
			OR	IC95%	P	OR	IC95%	P
Idade (anos)	53,08±13.32	55,6 ± 12.10	1,06	0,999-1,033	0.0604			
Homens/Mulheres (n)	51,23%(83) / 48,7%(79)	57,71%(116) / 42,29%(85)	1,299	0,857-1,969	0,2181			
Diabetes tipo 2 (n)	**17,61 (28)**	**27,27 (54)**	**1,754**	**1,049-2,933**	**0,0321**			
Dislipidemia (n)	**15,09% (24)**	**23,86% (47)**	**1,764**	**1,022-3,040**	**0,0412**			
HAS (n)	**34,59% (55)**	**50,51% (100)**	**1,931**	**1,256-2,967**	**0,0027**			
Obesidade (n)	**18,87% (30)**	**38,19% (76)**	**2,660**	**1,629-4,329**	**<0,0001**			
S. Metabólica (n)	**13,21% (21)**	**30,96% (61)**	**2,950**	**1,701-5,102**	**0,0001**	**2,227**	**1,070-2,756**	**0,0252**
Hipotireoidismo (n)	16,35% (26)	17,68% (35)	1,098	0,629-1,916	0,7420			
Resistência Insulínica	**40,12% (65)**	**62,19% (125)**	**2,457**	**1,605-3,831**	**<0,0001**	**1,720**	**1,070-2,756**	**0,0252**
AST (U/L)	**54,70 ± 45,58**	**70,26 ± 54,05**	**1,007**	**1,002-1,012**	**0,0053**			
ALT (U/L)	**57,99 ± 46,52**	**77,14 ± 53,47**	**1,009**	**1,004-1,014**	**0,0006**			
Fosfatase alcalina (U/L)	81,22 ± 31,62	83,93 ± 36,63	1,002	0,996-1,009	0,4574			
GGT (U/L)	**79,52 ± 85,57**	**120,92±124,2**	**1,004**	**1,002-1,007**	**0,0007**	**1,003**	**1,000-1,006**	**0,0134**
Creatinina (mg/dL)	0,96 ± 0,87	0,83 ± 0,22	0,478	0,227-1,005	0,0515			
Colesterol total(mg/dL)	157,67±33,13	157,16±38,43	1,000	0,994-1,005	0,8925			
HDL (mg/dL)	53,74 ± 16,59	50,81 ± 16,09	0,989	0,976-1,002	0,0920			
LDL (mg/dL)	86,44 ± 29,76	84,02 ± 32,48	0,998	0,991-1,004	0,4654			
Triglicerídeos(mg/dL)	**94,76 ± 51,15**	**107,64±53,20**	**1,005**	**1,001-1,010**	**0,0236**			
PNPLA3 C/G (n)	43,48% (70)	52,24% (105)	1,422	0,937-2,155	0,0979			
PNPLA3 CG/CC (n)	37,89%(61) / 56,52%(91)	43,28%(87) / 47,76%(96)	1,352	0,875-2,089	0,1928			
PNPLA3 GG/CC (n)	5,59%(9) / 56,52%(91)	8,96%(18) / 47,76%(96)	1,896	0,810-4,435				
TM6SF2 CT/CC (n)	9,94% (16) / 90,06% (145)	12,06% (24) / 87,94% (175)	1,243	0,636-2,428	0,5246			

Regressão logística – análise univariada e multivariada. **Abreviações:** ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; IC: intervalo de confiança; GGT: gamaglutamiltransferase; HCV: vírus da hepatite C; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade; OR: odds ratio; DP: desvio padrão. ***p<0,05**.

Tabela 13. Variáveis associadas com atividade necroinflamatória hepática moderada a intensa em pacientes com HCV (n=365)

	METAVIR A0-1	METAVIR A2-3	ANÁLISE UNIVARIADA			ANÁLISE MULTIVARIADA		
			OR	IC95%	P	OR	IC95%	P
Idade (anos)	50,58 ± 13,33	55,45 ± 12,30	**1,030**	**1,012-1,049**	**0,0014**	**1,30**	**1,010-1,050**	**0,0027**
Homens/Mulheres (n)	59,42% (82) / 40,58% (56)	51,85% (84)/ 48,15% (78)	1,361	0,859-2,151	0,1892			
Diabetes tipo 2 (n)	18,98% (26)	23,13% (37)	1,779	0,731-2,257	0,3841			
Dislipidemia (n)	17,65% (24)	22,50% (36)	1,355	0,762-2,410	0,3016			
HAS (n)	37,96% (52)	41,25% (66)	1,148	0,719-1,832	0,5632			
Obesidade (n)	26,67% (36)	32,50% (52)	1,325	0,799-2,193	0,2759			
S. Metabólica (n)	20,59% (28)	25% (40)	1,285	0,743-2,227	0,3691			
Hipotireoidismo (n)	16,06% (22)	17,50% (28)	1,109	0,601-2,045	0,7415			
HOMA-IR ≥ 2.5 (n)	**45,65% (63)**	**58,64% (95)**	**1,689**	**1,067-2,667**	**0,0251**			
AST (U/L)	**52,40 ± 41,48**	**66,82 ± 51,34**	**1,007**	**1,002-1,013**	**0,0107**	**1,007**	**1,001-1,012**	**0,0273**
ALT (U/L)	**58,75 ± 46,90**	**74,40 ± 54,66**	**1,007**	**1,001-1,012**	**0,0112**			
Fosfatase alcalina (U/L)	**74,37 ± 26,99**	**82,53 ± 33,82**	**1,009**	**1,001-1,018**	**0,0277**			
GGT (U/L)	84,20 ± 84,59	101,20 ± 90,77	1,002	1,000-1,005	0,1015			
Creatinina (mg/dL)	0,86 ± 0,27	0,89 ± 0,82	1,093	0,731-1,635	0,6633			
Colesterol total(mg/dL)	158,60 ± 36,16	159,57 ± 35,79	1,001	0,994-1,007	0,8166			
HDL (mg/dL)	**54,57 ± 16,77**	**50 ± 16,01**	**0,983**	**1,003-1,032**	**0,0184**	**1,021**	**1,006-1,037**	**0,0059**
LDL (mg/dL)	85,11 ± 30,93	87,34 ± 32,90	1,002	0,995-1,009	0,5493			
Triglicerídeos(mg/dL)	103,42 ± 61,40	104,74 ± 48,23	1,000	0,996-1,005	0,8348			
PNPLA3 C/G (n)	50,36%(69) / 49,64%(68)	53,70% (87) / 46,3% (75)	1,143	0,725-1,803	0,564			
PNPLA3 CC/GG (n)	50,36% (69) / 7,41% (12)	53,70% (87) / 7,41% (12)	1,366	0,586-3,189	0,751			
PNPLA3 CG/GG (n)	40,15% (55) / 7,41% (12)	38,89% (63) / 7,41% (12)	1,241	0,523-2,944				
TM6SF2 CT/CC (n)	11,59%(16) / 88,41%(122)	13,13%(21) / 86,88%(139)	1,152	0,575-2,307	0,689			

Regressão logística – análise univariada e multivariada. **Abreviações:** ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; IMC: índice de massa corporal; IC: intervalo de confiança; GGT: gamaglutamiltransferase; HCV: vírus da hepatite C; HDL: lipoproteína de alta densidade; HOMA-IR: Homeostatic Model of Assessment; LDL: lipoproteína de baixa densidade; OR: odds ratio; DP: desvio padrão. ***p<0,05**.

Foram testadas todas as combinações possíveis entre os polimorfismos e os desfechos avaliados, porém a análise combinada dos genótipos não mostrou interações estatisticamente significantes: fibrose hepática significativa F2-4 (p=0,0793); esteatose G1-3 (p=0,1615) e inflamação Metavir A2-3 (p=0,06933).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho incluiu a maior amostra de brasileiros com hepatite C crônica avaliados para os polimorfismos dos genes TM6SF2 e PNPLA3 até o momento. O grupo comparador foi construído a partir de voluntários saudáveis para comparar as frequências dos polimorfismos e contextualizar sua distribuição com a do grupo com HCV. Neste estudo transversal, nós pudemos demonstrar que pacientes com o genótipo GG do PNPLA3, em relação àqueles CG / CC, tinham menor IMC e menor frequência de SM, porém sem qualquer outra associação clínica, bioquímica ou histológica significante. Em contraste, o genótipo CT do TM6SF2, em relação ao genótipo selvagem (CC), mostrou 1,95 vezes maior chance de fibrose hepática significativa pela análise univariada. O genótipo CC do TM6SF2, por sua vez, foi associado com maior frequência de HAS, obesidade e SM, além de maiores níveis séricos de fosfatase alcalina e colesterol total, em relação aos genótipos CT/TT. Curiosamente, nenhum dos polimorfismos pesquisados mostrou associação com a presença de esteatose hepática.

Todos os pacientes do grupo HCV foram previamente submetidos à biópsia hepática enquanto virgens de tratamento antiviral, garantindo o estadiamento da esteatose e fibrose hepática pelo método padrão-ouro, sem a influência de terapias antivirais prévias que pudessem modificar a história natural da doença. Atualmente, estudos com avaliação histológica em pacientes virgens de tratamento estão cada vez mais escassos, reforçando a qualidade da nossa amostra. Em nosso grupo, observamos todas as faixas de fibrose hepática, garantindo representatividade adequada de cada fase da doença.

Nossa coorte com HCV apresentou idade média de 54 anos, além de uma frequência relativamente alta de SM (23%), obesidade (29%), DM2 (23%) e HAS (43%). Outras publicações já mostraram que esses são fatores sabidamente associados à fibrose hepática em HCV, o que poderia explicar o percentual elevado de fibrose avançada observado em nossa amostra (cerca de 46% dos pacientes com F3-F4). Petta et al. (2008), através de 200 sujeitos com o genótipo viral 1, concluíram que DM2 e resistência à insulina contribuem para a fibrose avançada, independente do grau de esteatose.[111] Huang et al. (2015), em estudo com 1077 pacientes com HCV, observaram que DM2 é um dos principais fatores de risco independentes para a fibrose avançada nessa população.[62] Outros estudos também observaram risco aumentado de fibrose hepática associado à idade avançada no momento do diagnóstico do HCV, à elevação dos níveis das enzimas hepáticas e à presença de DM2 e/ou SM.[13, 112-115]

O genótipo viral tipo 1 foi o mais frequente em nosso grupo, seguido pelos genótipos 3 e 2, distribuição também compatível com dados previamente publicados em brasileiros.[11]

Sabe-se que o HCV é capaz de influenciar o metabolismo glicêmico e lipídico do portador em uma parcela significativa dos infectados por meio de complexas vias metabólicas, com relatos de melhora do perfil glicêmico após a RVS e aumento da resistência insulínica em pacientes com maior carga viral.[114, 116, 117] Publicações anteriores mostraram elevadas prevalências de resistência insulínica, DM2, SM e obesidade em pacientes com HCV em comparação a controles não infectados.[114, 118] [81, 119, 120] Nesse contexto, as

altas prevalências de SM e DM2 encontradas em nossa amostra poderiam ser atribuídas à própria presença do vírus. Além disso, segundo publicação recente do Ministério da Saúde do Brasil (2019), a prevalência de obesidade vem crescendo progressivamente, saindo de 11,8% em 2006 para 19,8% dos brasileiros em 2018, aproximando-se dos valores observados em nosso trabalho.[121]

Ainda em relação à nossa amostra, todos os genótipos pesquisados em ambos os grupos (saudáveis e HCV) foram adequadamente testados e não violaram o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Isso simboliza que a distribuição das frequências genotípicas e alélicas permanece estável, o que fortalece a ideia de que nossa amostra foi obtida de forma aleatória e não correlacionada, sendo constituída por indivíduos representativos de uma população que, conforme esperado, não está em evolução.

Para o TM6SF2, nosso trabalho mostrou forte predomínio da forma selvagem, com 88,95% dos pacientes com o genótipo CC, enquanto 11,05% deles apresentavam os demais (CT + TT). O genótipo TT foi observado em apenas dois pacientes com HCV e em nenhum dos indivíduos saudáveis. Tais resultados são compatíveis com o observado pela meta-análise de Liu et al. (2017), segundo a qual a variante E167K do TM6SF2 foi observada entre 6,3 e 12,2% dos pacientes com HCV.[104]

Estudos experimentais e clínicos em DHGNA sugerem que o alelo T do TM6SF2 provoca a perda de função do gene, levando ao acúmulo hepático de lipídios e TG, enquanto o alelo C desempenha o papel oposto, protegendo

contra a esteatose hepática através do estímulo à secreção hepática de VLDL, ao mesmo tempo em que aumenta os níveis séricos de colesterol e aumenta potencialmente o risco de eventos cardiovasculares.[43, 44, 85, 86, 97, 122] Outras publicações também sugeriram que, além da esteatose, o polimorfismo do TM6SF2 estaria associado à progressão da fibrose.[92, 95, 96] Dentre os mecanismos plausíveis, acredita-se que o acúmulo hepático de gorduras promoveria à depleção mitocondrial de glutationa, aumentando a susceptibilidade dos hepatócitos às vias inflamatórias mediadas por citocinas, além de sensibilizar as células estreladas hepáticas pelas vias relacionadas aos receptores *Toll-like* 4 e ao Fator de crescimento Beta.[123, 124] Além disso, alguns autores defendem que existam vias metabólicas alternativas ainda desconhecidas que promovam a fibrogênese hepática de forma independente da esteatose. [90-92, 95]

Apesar das evidências em DHGNA, permanece controverso o papel do gene TM6SF2 na interação vírus-hospedeiro e na história natural da doença hepática pelo HCV. Sabe-se que as proteínas virais, entre outros mecanismos, atuam no metabolismo hepático de gorduras durante o seu ciclo de vida, e o TM6SF2 poderia influenciar esse processo.

Nossos resultados mostraram uma associação positiva da variante E167K do TM6SF2 com fibrose significativa no contexto da doença hepática pelo HCV. Tal relação foi observada tanto pela análise das associações entre os polimorfismos quanto na regressão logística univariada e está de acordo com o observado em outras publicações.[92, 95, 96]. No entanto, o peso das variáveis ligadas à síndrome metabólica parece sobrepor-se à influência

isolada do TM6SF2 na fibrose hepática, que não mostrou significância estatística na análise multivariada. Acreditamos que o polimorfismo do TM6SF2 possa atuar como um cofator na progressão da doença hepática, o qual combinado a outros fatores da SM predispõe ao desenvolvimento da fibrose. Infelizmente, em comum acordo com equipe estatística, a análise de subgrupos com os pacientes obesos e/ou com síndrome metabólica não foi realizada pelo alto risco de fragmentação da amostra e potenciais resultados incongruentes.

Trabalhos prévios em populações caucasianas mostraram haver relação entre o polimorfismo do TM6SF2 e fibrose hepática, porém o nosso estudo traz um dado importante para uma população miscigenada formada exclusivamente por brasileiros.[90, 99, 104] A associação com fibrose, apesar da ausência de relação com esteatose, fortalece a hipótese da existência de vias alternativas de estímulo à progressão da doença hepática que funcionam de forma independente do depósito de gorduras.

O genótipo CC do TM6SF2, por sua vez, apresentou associação significante com maiores níveis séricos de colesterol total, achado compatível com o estímulo à secreção hepática de VLDL creditado ao alelo selvagem.[89, 94, 104] Porém, não foi possível analisar a associação do polimorfismo com a ocorrência de eventos cardiovasculares devido ao caráter retrospectivo deste estudo, que impossibilita qualquer conclusão sobre risco, além da ocorrência de poucos eventos cardiovasculares entre os nossos pacientes (apenas 17 sujeitos), o que fragmentou a amostra e fragilizaria qualquer análise. Novos

estudos maiores e prospectivos são necessários para avaliar essa última associação.

A relação dos genótipos do TM6SF2 com os fatores da SM permanece controversa, com os poucos dados disponíveis tendo sido obtidos em publicações com DHGNA, sem hepatite C associada. Os nossos pacientes com o genótipo CC do TM6SF2 (selvagem) apresentaram maior frequência de obesidade, SM e HAS. Zhou et al. (2014), através de medições diretas, observaram maior sensibilidade hepática e periférica à insulina nos pacientes com os genótipos CT + TT, quando comparados ao genótipo CC, sugerindo que para o primeiro grupo, a DHGNA se comporta de forma metabolicamente silenciosa, uma vez que aumenta o depósito hepático de gorduras, sem o aumento concomitante da resistência insulínica.[125] Na contramão dos nossos achados, Viitasalo et al. (2016) sugeriram que o alelo T estaria associado com maior circunferência abdominal, sem diferenças entre os grupos a respeito de SM e resistência insulínica.[126] Outros autores, por sua vez, embora também tenham observado relação do genótipo CC com aumento do colesterol total, não observaram qualquer associação com resistência insulínica, IMC ou circunferência abdominal.[127, 128]

A primeira meta-análise sobre o TM6SF2 em hepatite C crônica foi publicada por Liu et al. em 2017 e reuniu 4.325 pacientes. Os autores concluíram que o risco de esteatose avançada e fibrose são maiores em portadores da variante E167K. O risco de cirrose (OR: 2,05; IC95% 1,39–3,02) também foi significativamente maior.[104] Observou-se ainda a diminuição dos níveis séricos de TG e colesterol não-HDL entre os pacientes

com o genótipo CC (redução de 5.8 a 12.0%; p<0,05).[104] Em contrapartida, em outra meta-análise mais recente, Chen et al. (2019) incluíram 28 estudos sobre o TM6SF2, com uma população total de 13.137 casos e 11.010 controles, dos quais 2.969 eram portadores do HCV. Os autores observaram um aumento do risco global de doença hepática crônica por esse polimorfismo tanto em asiáticos quanto caucasianos, no entanto, quando avaliado o grupo com HCV isoladamente, tal associação não foi estatisticamente significante.[129] Desse modo, o tema ainda não está totalmente esclarecido e novos estudos com populações maiores e miscigenadas são necessários para uma melhor definição do papel do TM6SF2 na hepatite C crônica.

Quanto ao PNPLA3, as frequências dos genótipos CC, CG e GG foram de 51,37%, 41,21% e 7,42%, respectivamente. Tais valores foram semelhantes àqueles observados no grupo comparação (49,25% de CC, 41,04% de CG e 9,7% de GG). Essa distribuição se aproxima dos dados obtidos em revisão sistemática de Severson et al. (2016), que incluíram 2.504 indivíduos de diferentes etnias e encontraram frequências globais dos genótipos CC, CG e GG de 56,9%, 33,8% e 9,3%, respectivamente.[51]

A partir dos estudos em DHGNA, sabe-se que o polimorfismo I148M do PNPLA3 leva à síntese de uma proteína de membrana disfuncional (adiponutrina), que se acumula na superfície de gotículas lipídicas nos hepatócitos e impede o acesso de outras lipases, comprometendo a mobilização de ácidos graxos livres, com consequente acúmulo de gordura nos hepatócitos - desencadeando esteatose e inflamação - além de

comprometer a degradação dos ésteres de retinol nas células estreladas hepáticas, estimulando a fibrogênese.[29-32, 65, 130]. Em hepatite C crônica, no entanto, o papel dos polimorfismos do PNPLA3 não está totalmente estabelecido, já que os determinantes genéticos e ambientais do hospedeiro recebem a influência de complexos mecanismos virais.[131]

Ao analisar os polimorfismos do PNPLA3 em nossa coorte com HCV, não encontramos associação com esteatose ou fibrose hepática, divergindo de outros dados publicados previamente que são convincentes nessa direção[35, 36, 41, 46, 47]. A análise combinada das variantes do PNPLA3 e do TM6SF2 no nosso grupo também não mostrou relação significante com esteatose, fibrose ou atividade necroinflamatória, sugerindo ausência de sinergismo entre os polimorfismos.

Dentre as explicações plausíveis para essas divergências com a literatura, a influência do vírus da hepatite C sobre o metabolismo hepático de gorduras poderia inibir o papel dos polimorfismos nessas vias metabólicas, anulando sua influência na progressão da doença hepática. Além disso, os brasileiros constituem uma população sabidamente heterogênea, conforme observado por Lins et al. (2010) em estudo que avaliou a ancestralidade genética dos brasileiros por meio de SNPs.[132] Essa miscigenação não foi representada nos trabalhos previamente publicados, que classicamente têm incluído populações predominantemente caucasianas ou asiáticas. Os diferentes resultados obtidos poderiam ser justificados pela coexistência de outras particularidades, genéticas ou não, ainda não reconhecidos em nossa população, as quais justificariam uma diferente expressão fenotípica do gene.

Por fim, o nosso poder estatístico pode não ter sido suficiente para testar a hipótese de existência de relação entre o polimorfismo do PNPLA3 e fibrose significativa e/ou esteatose hepáticas.

Curiosamente, mesmo no Brasil, alguns poucos trabalhos já publicados corroboram a associação da variante I148M do PNPLA3 com esteatose e fibrose hepática na DHGNA e na hepatite crônica C.[48, 74, 133] No entanto, no único desses estudos que incluiu uma coorte formada exclusivamente por pacientes com HCV, Manchiero et al. (2017) utilizaram uma amostra menor do que a nossa (290 indivíduos), e encontraram uma distribuição não usual dos genótipos do PNPLA3, com forte e inesperado predomínio do alelo G (34,4% com o genótipo GG, enquanto 45,9% deles tinham o genótipo CC e 21% com o CG), em desacordo com os valores observados na literatura, o que pode estar relacionado com a representatividade da amostra utilizada[74]. Outro aspecto digno de nota é que a configuração genética desta casuística poderia estar em evolução para este SNP específico, visto que não foi fornecida informação a respeito do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o PNPLA3, o que poderia comprometer seus achados e conclusões.[74] Em publicação subsequente do mesmo grupo, foi descrita associação do PNPLA3 com esteatose e fibrose em pacientes com HCV, entretanto, a população não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para este SNP (p= 0,000).[134]

Assim como em nosso trabalho, algumas outras publicações também não encontraram relação entre o polimorfismo do PNPLA3 e a progressão da doença hepática pelo HCV. Estudo recente de Huang et al (2017) avaliou

1.080 asiáticos com hepatite C e não mostrou associação significativa do alelo G com fibrose hepática.[72] Nakamura et al. (2013) em estudo com 260 japoneses avaliados por ultrassonografia também não identificaram relação do PNPLA3 com esteatose ou cirrose.[71] Zampino et al. (2013) encontraram associação com esteatose, porém não com fibrose hepática.[73]

Duas meta-análises publicadas com hepatite C, por sua vez, mostraram resultados compatíveis com aqueles descritos para a DHGNA. Salameh et al. (2016) observaram que o alelo G está associado a maior gravidade de todo o espectro da doença hepática pelo HCV: esteatose (OR 2,214; IC95%: 1,719 – 2,853), fibrose avançada/cirrose (OR 1,762; IC95% 1,258 – 2,468) e CHC (OR 2,002; IC95%:1,519-2,639).[135] Jia-Hao Fan et al. (2016) também mostraram maior gravidade da fibrose e esteatose em caucasianos com o genótipo GG em relação ao CC e CG (OR: 2,29; IC95% 1,57-3,35 e OR: 4,33; IC95% 2,59-7,22, respectivamente).[136] No entanto, nenhum desses trabalhos incluiu estudos com populações miscigenadas como a nossa.

A relação entre os polimorfismos do PNPLA3 e os fatores da SM também permanece controversa na literatura, e a maioria dos dados disponíveis até o momento foram obtidos em trabalhos com DHGNA. Além disso, a relação direta do HCV com o metabolismo das gorduras e resistência insulínica limita a extrapolação de resultados obtidos em pacientes sem o vírus. Em nosso trabalho, os pacientes homozigotos para o alelo G do PNPLA3, quando comparados aos demais, apresentaram menor frequência de SM e menor média do IMC. Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo

que avaliou diretamente a associação dos polimorfismos com os fatores da síndrome metabólica em pacientes com HCV.

Em concordância ao observado em nossa análise, Xia et al. (2016) observaram um melhor perfil metabólico entre os portadores da variante I148M do PNPLA3. Comparados ao genótipo CC, pacientes com o genótipo GG apresentaram maior conteúdo hepático de gorduras, em detrimento de uma menor média do IMC e da circunferência abdominal.[137] Em adição, Del Ben et al. (2014) mostraram que o gene PNPLA3 I148M estava associado com menor prevalência de SM e seus componentes em 211 pacientes com DHGNA conhecida.[138] Por fim, Park et al. (2015) avaliaram 1.363 homens coreanos saudáveis após excluir álcool e causas secundárias de esteatose hepática. Nesse grupo, a variante I148M esteve associada à redução do nível da adiposidade central, IMC, níveis séricos de TG e resistência à insulina. Os homozigotos GG, quando comparados aos CC, apresentaram maior conteúdo hepático de gorduras e grau de fibrose mais avançado, a despeito do melhor perfil metabólico, sugerindo que os sujeitos com o alelo G são mais sensíveis aos efeitos deletérios dos fatores metabólicos.[139]

De forma contraditória, trabalho recente publicado por Karamfilova et. al (2019) avaliou 208 pacientes obesos (125 sem resistência à insulina e 83 com pré-diabetes estabelecida) e encontrou que pacientes com os genótipos GG e CG do PNPLA3, quando comparados com os portadores do genótipo CC, apresentaram 9,6 vezes mais distúrbios da glicose (OR 9,649, IC95% 2,100-44,328, p=0,004), três vezes maior frequência da SM (OR 2,939, IC95%: 1,590-5,434, p=0,001) e 2,1 vezes maior prevalência de resistência à

insulina (OR 2,127, IC95%: 1,078-4,194, p=0,029).[140] Wang et al. (2011) já tinha mostrado que os pacientes com o polimorfismo do PNPLA3 apresentavam maior circunferência abdominal, insulina de jejum, HOMA-IR, ALT e ferritina; sugerindo associação do SNP com resistência insulínica em uma população sabidamente normoglicêmica.[52] Mangge et al. (2015), por sua vez, compararam um grupo de pacientes com obesidade ou sobrepeso e SM com um segundo grupo de obesos e sobrepeso, sem SM, e observaram que o alelo G era mais frequente no primeiro grupo (p=0.038).[141]

Outros autores, por outro lado, não observaram qualquer relação entre os polimorfismos e os fatores da SM. Romeo et al. (2008) não identificaram associação do PNPLA3 com IMC ou resistência à insulina em seu trabalho original.[33] Speliotes et al. (2010) também não observaram qualquer associação da variante genética com IMC, TG, perfil lipídico ou DM2.[55] Nessa mesma linha, Sookoian at al. (2011), em meta-análise sobre o tema, mostraram ausência de diferença significante entre os genótipos do PNPLA3 com o HOMA-IR (de um total de 1.404 sujeitos), glicemia, níveis séricos de insulina e IMC (informações obtidas de um banco de dados de 4.141 indivíduos).[54]

A esteatose hepática está presente em mais da metade dos pacientes incluídos nesse trabalho (55,09%), frequência compatível com a margem descrita na literatura de 50 a 72% dos portadores do HCV.[142, 143] No contexto da hepatite C crônica, a esteatose é considerada por alguns autores como uma entidade distinta, com características clínicas e fatores prognósticos particulares, que pode acelerar a progressão da fibrose e até mesmo interferir

com as taxas de resposta ao tratamento antiviral dos esquemas com interferon.[20, 21, 144]

Além do risco aumentado de esteatose hepática associado à maior prevalência dos fatores da síndrome metabólica nos pacientes com HCV, acredita-se que existam outros mecanismos virais relacionados que ainda não estão totalmente esclarecidos. Estudos experimentais *in vitro* e em modelo animal mostram que o próprio ciclo de vida do HCV está intimamente relacionado às vias do metabolismo do colesterol e lipogênese nos hepatócitos e que, nesse contexto, as proteínas virais poderiam induzir o acúmulo hepatocelular de gordura por vias metabólicas próprias que envolvem a inibição da degradação e da secreção de VLDL, aumento da lipogênese, além de complexas vias de indução de resistência insulínica no portador.[125, 145, 146]. Para o HCV genótipo 3, em especial, acredita-se que o core viral e a proteína não estrutural 5A interfiram nas vias do metabolismo hepático do colesterol e da glicose, aumentando o risco de esteatose inclusive em relação aos outros genótipos virais.[146]

Assim, a esteatose hepática nos pacientes com HCV é consequência de uma complexa interação entre fatores virais e do hospedeiro, porém ainda não se sabe qual o peso de cada fator quando avaliados em combinação. Nesse contexto, diferentemente dos resultados obtidos em DHGNA, a ausência de associação do TM6SF2 e do PNPLA3 com esteatose hepática em nossos pacientes poderia ser explicada pela complexidade das interações entre as proteínas virais e as vias de sinalização da insulina e metabolismo lipídico hepático, modificando as respostas metabólicas esperadas

isoladamente para cada polimorfismo na progressão da doença hepática.[147] Em nossa amostra, as únicas variáveis efetivamente associadas à esteatose hepática de forma independente foram SM, resistência à insulina e maiores níveis séricos de GGT, fatores esses sabidamente relacionados ao maior depósito hepático de gorduras.[1, 13, 112, 148]

O presente estudo tem algumas limitações. Primeiramente, a falta de informações sobre a ancestralidade genética dos participantes e outros fatores sabidamente confundidores, como a distribuição da gordura corporal e o histórico de tabagismo, podem ter afetado os resultados obtidos. Em segundo lugar, o desenho transversal, que somado ao fato de todos os participantes terem sido recrutados a partir de um único centro terciário, limitam a validação externa da nossa análise e dificultam suposições de causalidade. Por fim, não foi feita a sistematização da avaliação anatomopatológica por um único observador, embora apenas profissionais experientes tenham realizado a leitura das lâminas e a padronização da classificação histológica limite a variabilidade interobservador.

Novos estudos longitudinais com populações de maior diversidade étnica precisam ser realizados para confirmar a generalização das associações dos polimorfismos dos genes TM6SF2 e PNPLA3 com a doença hepática crônica pelo HCV. Além disso, espera-se que novas pesquisas possam avaliar diretamente o impacto do uso clínico desses polimorfismos na tomada de decisões de forma personalizada, guiada pelo perfil genético do paciente, possibilitando melhor direcionamento de recursos e uma estratégia de vigilância individualizada, inclusive no pós RVS.

Outras associações têm sido pesquisadas nos últimos anos e também podem ser alvo de novos estudos com brasileiros. No contexto da DHGNA e da doença hepática alcoólica, a variante I148M do PNPLA3 é considerada fator de risco independente para CHC.[149-152] Para hepatite C e outras hepatopatias crônicas, no entanto, essa associação permanece controversa, aparecendo em algumas publicações como marginal ou ausente.[149, 150, 153-155] Os polimorfismos também têm sido estudados no transplante hepático para avaliar o seu papel no prognóstico do enxerto e no risco de esteatose *de novo*, porém não existem dados em brasileiros[156-158]

6. CONCLUSÕES

1. Entre os nossos pacientes com HCV, a distribuição dos genótipos do TM6SF2 foi de 88,95% para o genótipo CC e 11,05% para os demais (CT + TT). Para o PNPLA3, encontramos 51,37% de pacientes CC, 41,21% do genótipo CG e 7,42% do genótipo GG.
2. O genótipo CT do TM6SF2 foi associado à fibrose hepática significativa quando comparado aos portadores do genótipo CC pela análise univariada.
3. Os pacientes com o genótipo CC do TM6SF2, quando comparado aos portadores do genótipo CT / TT, apresentaram maior frequência de obesidade, síndrome metabólica, HAS, além de níveis séricos mais elevados de colesterol total.
4. Portadores do genótipo GG do PNPLA3, quando comparados com os genótipos CG e CC, apresentaram menor frequência de síndrome metabólica e menor média de IMC. Nenhuma outra diferença foi observada em relação às demais variáveis histológicas, clínicas e bioquímicas avaliadas.
5. Fibrose hepática significativa foi associada a elevações séricas de ALT, fosfatase alcalina, colesterol total e idade.
6. Os polimorfismos dos genes PNPLA3 e TM6SF2, quando analisados isoladamente ou em combinação, não foram associados à esteatose hepática. Os únicos fatores relacionados foram a presença de síndrome metabólica, resistência insulínica e maiores níveis séricos de GGT.

7. ANEXOS

Anexo 7.1 - Aprovação do projeto de pesquisa pela comissão de ética e pesquisa do HC-FMUSP.

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência dos Polimorfismos nos Genes Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Hepatite C Crônica

Pesquisador: DANIEL FERRAZ DE CAMPOS MAZO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55378016.7.1001.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.676.105

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao protocolo de pesquisa solicitando inclusão de um novo projeto que será um braço do protocolo, tendo como título "Influência da ancestralidade genética e polimorfismos do gene PNPLA3 I148M na evolução e prognóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica do fígado em pacientes procedentes de uma população miscigenada.". Será um projeto de pós doutorado da aluna Lourianne Nascimento Cavalcante tendo como orientadora Professora doutora Cláudia Pinto Marques Souza de Oliveira, professora associada da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Não haverá modificação no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo assim será utilizado o mesmo do protocolo já aprovado.Solicitam também a inclusão do pesquisador executante, Arthur Ivan Nobre Oliveira, como aluno de Doutorado. Que realizará atividades relacionadas ao protocolo supracitado em pacientes com doença hepática pelo vírus da Hepatite C.

Data

modificações adequadas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a prevalência dos polimorfismos nos genes Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 (PNPLA3) e Transmembrane 6 Superfamily Member 2 (TM6SF2) na doença hepática gordurosa

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.676.105

não alcoólica e hepatite C crônica;2- Estimar a associação entre estes polimorfismos com gravidade histológica da doença hepática gordurosa não alcoólica (esteatose, inflamação, balonização hepatocelular e fibrose) e relação com

componentes da síndrome metabólica e resistência insulínica;3- Estimar a associação destes polimorfismos com esteatose e fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento, e sua relação com componentes da síndrome metabólica;4- Avaliar a associação destes polimorfismos com taxa de filtração glomerular calculada pelas fórmulas de Cockcroft-Gault e MDRD nesta população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em pequenos hematomas, equimose (mancha roxa) e ardência local. SO desconforto e os riscos são mínimos e incluem pequenos hematomas, equimose (mancha roxa) e ardência local. Não há benefício direto para o paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A literatura mostra que algumas alterações genéticas podem estar relacionadas com a progressão da doença gordurosa do fígado não alcoólica e da hepatite crônica pelo vírus C. A identificação destas alterações podem permitir no futuro avaliar o risco de ter doença grave e mesmo ajudar no entendimento destas doenças. Sendo uma pesquisa relevante para a nossa população e decisões futuras de tratamento e conduta clínica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados, o pesquisador solicita a utilização do mesmo termo pois nessa emenda inclui um subprojeto que utilizará os mesmos dados para a confecção do projeto de Post doc do Pos-doutorando Lourianne Nascimento Cavalcante.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 25 de Maio de 2018

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Anexo 7.2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

_____

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

1. NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M □ F □
DATA NASCIMENTO ____./_____/_____
ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO: _____
BAIRRO_____ CIDADE _____
CEP _____ TELEFONE (_____) _____

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Influência dos Polimorfismos nos Genes *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) e *Transmembrane 6 Superfamily Member 2* (TM6SF2) na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Hepatite C Crônica**

PESQUISADOR: DANIEL FERRAZ DE CAMPOS MAZO

CARGO/FUNÇÃO: Médico Gastroenterologista e Hepatologista Assistente-Doutor e Professor Colaborador do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA: 107.866

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO	□
RISCO BAIXO	□	RISCO MAIOR	□

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses.

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

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Convidamos o(a) Sr(a). para participar desta pesquisa. Essas informações são fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. A doença gordurosa do fígado não alcoólica é uma doença caracterizada pelo depósito de gordura no fígado em pacientes sem uso significativo de álcool, e pode se tornar crônica e provocar cirrose. Esta doença está relacionada com obesidade, diabetes, pressão alta e alteração no colesterol ou triglicerídeos. A infecção de longa data pelo vírus da hepatite C também pode evoluir para cirrose. A doença crônica do fígado pode prejudicar ou até mesmo impedir a realização de muitas tarefas do seu dia-a-dia e comprometer a sua qualidade de vida. Este estudo tem como objetivo avaliar fatores clínicos, genéticos (de DNA) e de exames laboratoriais associados com a evolução da doença gordurosa do fígado e da inflamação crônica do fígado pelo vírus da hepatite C. Esta avaliação será feita através da avaliação de exames laboratoriais já realizados pelo sr (a) durante o seu acompanhamento médico de rotina, assim como de resultados de exames de imagem e de biópsias de fígado caso tenha realizado no seu acompanhamento. Será realizada uma coleta de exame de sangue para avaliação de algumas alterações genéticas (do DNA) que possam estar relacionadas com a evolução destas doenças.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Procedimentos específicos do presente estudo – os pacientes que aceitarem participar do estudo serão submetidos aos seguintes procedimentos, além de todos os demais que são realizados conforme a necessidade clínica (exames que não são específicos do estudo e cuja solicitação ficará a critério do seu médico). São propostos três procedimentos:

a) Entrevista para preencher um questionário, com duração de cerca de quinze minutos, visando obter dados sobre as causas e gravidade da doença do fígado, assim como outras doenças que o paciente apresente;

b) Consulta ao prontuário médico - solicitamos sua autorização para consultar as informações que estão em seu prontuário e os resultados dos exames laboratoriais, de imagem e endoscopias disponíveis no seu prontuário médico e que foram solicitados pelo seu médico como parte da sua avaliação.

c) Realização de coleta de exame de sangue para avaliação de alterações genéticas.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

A rotina de atendimento no Ambulatório de Hepatologia continuará a mesma, através de consultas médicas e exames feitos como habitual para acompanhamento e tratamento de pacientes com doença gordurosa do fígado não alcoólica e hepatite C. Estes procedimentos de rotina incluem exames de sangue, através de punção periférica de veia do antebraço, exames de imagem e biópsia de fígado, quando indicado pelo seu médico. Pedimos a permissão para utilização dessas informações no estudo em questão, através do armazenamento dos resultados dos exames, porém mantendo em sigilo a identificação do paciente. Além dos exames habituais, outros exames de caráter experimental serão solicitados. Para tal será necessária coleta de sangue por punção periférica de veia do antebraço, que será congelado para avaliação de alterações genéticas que podem estar associadas com a progressão da doença gordurosa do fígado não alcoólica e da hepatite C. Este material proveniente da coleta de sangue (material biológico humano) será armazenado na Instituição. **A biópsia hepática já pode fazer parte da rotina de seu acompanhamento médico, e não será feita exclusivamente para este estudo.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados no procedimento dos itens 2 e 3

Coleta de sangue – a amostra será colhida de uma veia do braço para avaliação genética. O desconforto e os riscos são mínimos e incluem pequenos hematomas, equimose (mancha roxa) e ardência local. **Será realizada somente uma coleta de sangue no início do estudo.**

5 – Benefícios para o participante

A literatura médica tem demonstrado que algumas alterações genéticas podem estar relacionadas com a progressão da doença gordurosa do fígado não alcoólica e da hepatite crônica pelo vírus C. A identificação destas alterações podem permitir no futuro avaliar o risco de ter doença grave e mesmo ajudar no entendimento de como estas doenças machucam o fígado. Não há benefício direto para o participante, mas aquele que concordar em participar do estudo contribui para o melhor entendimento científico da doença que apresenta e para o desenvolvimento de futuros tratamentos de outras pessoas.

6 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas

O principal investigador é o Dr. *Daniel Ferraz de Campos Mazo,* que pode ser encontrado no endereço: *Serviço de Gastroenterologia Clínica. Instituto Central, 9 andar, sala 9159. Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar 255, São Paulo.* Telefone(s) 2661-6447. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661- 6442 ramais 16, 17, 18, ou (11) 2661-7585; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição

O paciente terá o direito de solicitar esclarecimentos a qualquer momento, dirigindo suas dúvidas a qualquer um dos investigadores a qualquer momento. Essas informações incluem, porém não se limitam, à indicação dos procedimentos, benefícios e riscos. O paciente é livre para decidir se quer participar ou não desse estudo, tendo o direito de solicitar esclarecimentos em qualquer fase da pesquisa. O paciente não está obrigado a nenhum compromisso, podendo retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que isso implique qualquer tipo de prejuízo em relação ao tratamento que recebe ou receberá na instituição, ficando claro e garantido que terá direito a receber o mesmo tratamento dispensado aos demais pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os pesquisadores se comprometem a tratar no Hospital das Clínicas da FMUSP quaisquer danos à saúde decorrentes direta ou indiretamente da pesquisa, inclusive aqueles surgidos em situação de emergência. O participante receberá uma via deste termo de consentimento

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente

Os dados obtidos no presente estudo serão tratados de forma anônima e somente os investigadores do estudo terão acesso a esses dados, que serão mantidos de forma estritamente confidencial. Fica assegurado o direito à confidencialidade, sigilo e privacidade do paciente, conforme preceitua o código de ética médica.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores

O direito é assegurado em todas as etapas do projeto.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se

existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa

Fica assegurado ao paciente demandar por indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa, conforme as leis do país. A aceitação em participar do estudo não implica renúncia a esse direito.

12 – Armazenamento de amostra de sangue em biorrepositório

1. O material biológico humano armazenado no Biorrepositório é do senhor(a), permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional e o gerenciamento será feito pelo pesquisador responsável.
2. O senhor(a), ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo senhor(a) ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.
3. O prazo de armazenamento de material biológico humano no Biorrepositório será de acordo com o cronograma da pesquisa, sendo que o prazo máximo é de 10 anos.
4. O senhor(a) será informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório.
5. Não será solicitado patenteamento e não haverá utilização comercial do seu material biológico humano armazenado no Biorrepositório.
6. Caso o senhor(a) autorize, o seu material biológico armazenado poderá ser utilizado posteriormente em outras pesquisas que avaliem alterações genéticas que possam estar relacionadas com doenças do fígado. Toda nova pesquisa só será realizada com aprovação do sistema CEP-CONEP.

( ) concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.
( ) concordo em participar do presente estudo e *AUTORIZO* o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.
( ) concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Influência dos Polimorfismos nos Genes *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3* (PNPLA3) e *Transmembrane 6 Superfamily Member 2* (TM6SF2) na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Hepatite C Crônica". Eu discuti com o *Dr. Daniel Ferraz de Campos Mazo* ou pessoa(s) por ele delegada(s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador. Poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

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

_____
Assinatura da testemunha Data ___/___/___
para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto) - Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____
Data ___/___/___
Assinatura do responsável pelo estudo

8. REFERÊNCIAS

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

2. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, et al. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. Gastroenterology. 2017;152(5):1090-9.e1.

3. Durand F, Francoz C. The future of liver transplantation for viral hepatitis. Liver Int. 2017;37 Suppl 1:130-5.

4. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico nº17. 2 ed. Brasilia, 2019. Disponível em:http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/66453/boletim_hepatites_2019_c_.pdf?file=1&type=node&id=66453&force=1.

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

6. Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. Nature. 2001;410(6825):235-40.

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

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

9. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2015;61(1):77-87.

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

11. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. Braz J Med Biol Res. 2005;38(1):41-9.

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

13. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. Gastroenterol Clin North Am. 2015;44(4):717-34.

14. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, van der Loeff MS, Rice TM, Bruneau J, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. Hepatology. 2014;59(1):109-20.

15. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. Gastroenterology. 1997;113(5):1675-81.

16. Datz C, Cramp M, Haas T, Dietze O, Nitschko H, Froesner G, et al. The natural course of hepatitis C virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. Gut. 1999;44(4):563-7.

17. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. Gastroenterology. 1997;112(2):463-72.

18. Lanini S, Pisapia R, Capobianchi MR, Ippolito G. Global epidemiology of viral hepatitis and national needs for complete control. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018;16(8):625-39.

19. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. Hepatology. 1999;29(4):1215-9.

20. Machado MV, Cortez-Pinto H. Insulin resistance and steatosis in chronic hepatitis C. Ann Hepatol. 2009;8 Suppl 1:S67-75.

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

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

23. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, Aids e hepatites virais. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. 2 ed. Brasilia, 2018. Disponível em: http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/57798/manual_tecnico_hepatites_virais_web_310818.pdf?file=1&type=node&id=57798&force=1.

24. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, Aids e hepatites virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfecções. 1 ed. Brasilia, 2019. Disponível em:http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/64644/pcdt_hepatite_c_03_2019_web.pdf?file=1&type=node&id=64644&force=1.

25. EASL. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. J Hepatol. 2018;69(2):461-511.

26. Tada T, Kumada T, Toyoda H, Sone Y, Takeshima K, Ogawa S, et al. Viral eradication reduces both liver stiffness and steatosis in patients with chronic hepatitis C virus infection who received direct-acting anti-viral therapy. Aliment Pharmacol Ther. 2018;47(7):1012-22.

27. Nahon P, Bourcier V, Layese R, Audureau E, Cagnot C, Marcellin P, et al. Eradication of Hepatitis C Virus Infection in Patients With Cirrhosis Reduces Risk of Liver and Non-Liver Complications. Gastroenterology. 2017;152(1):142-56.e2.

28. Mahale P, Engels EA, Li R, Torres HA, Hwang LY, Brown EL, et al. The effect of sustained virological response on the risk of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. Gut. 2018;67(3):553-61.

29. Sookoian S, Pirola CJ. PNPLA3, the triacylglycerol synthesis/hydrolysis/storage dilemma, and nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2012;18(42):6018-26.

30. Trépo E, Romeo S, Zucman-Rossi J, Nahon P. PNPLA3 gene in liver diseases. J Hepatol. 2016;65(2):399-412.

31. Pingitore P, Pirazzi C, Mancina RM, Motta BM, Indiveri C, Pujia A, et al. Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its

I148M mutation results in loss of function. Biochim Biophys Acta. 2014;1841(4):574-80.

32. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. J Biol Chem. 2011;286(43):37085-93.

33. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat Genet. 2008;40(12):1461-5.

34. Trépo E, Valenti L. Update on NAFLD genetics: From new variants to the clinic. J Hepatol. 2020;72(6):1196-209.

35. Dongiovanni P, Valenti L. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2016;65(8):1026-37.

36. Donati B, Motta BM, Pingitore P, Meroni M, Pietrelli A, Alisi A, et al. The rs2294918 E434K variant modulates patatin-like phospholipase domain-containing 3 expression and liver damage. Hepatology. 2016;63(3):787-98.

37. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, Pingitore P, Hedfalk K, Mancina RM, et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. Hum Mol Genet. 2014;23(15):4077-85.

38. Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, Meroni M, Lepore SM, Mancina RM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. Hum Mol Genet. 2016;25(23):5212-22.

39. Kovarova M, Königsrainer I, Königsrainer A, Machicao F, Häring HU, Schleicher E, et al. The Genetic Variant I148M in PNPLA3 Is Associated With Increased Hepatic Retinyl-Palmitate Storage in Humans. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(12):E1568-74.

40. Bruschi FV, Claudel T, Tardelli M, Caligiuri A, Stulnig TM, Marra F, et al. The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. Hepatology. 2017;65(6):1875-90.

41. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. Hepat Med. 2017;9:55-66.

42. Nobili V, Liccardo D, Bedogni G, Salvatori G, Gnani D, Bersani I, et al. Influence of dietary pattern, physical activity, and I148M PNPLA3 on steatosis severity in at-risk adolescents. Genes Nutr. 2014;9(3):392.

43. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat Genet. 2014;46(4):352-6.

44. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. PLoS One. 2012;7(6):e38322.

45. Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, et al. A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. J Med Genet. 2010;47(2):116-9.

46. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2010;51(4):1209-17.

47. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ, CRN N. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-

containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2010;52(3):894-903.

48. Mazo DF, Malta FM, Stefano JT, Salles APM, Gomes-Gouvea MS, Nastri ACS, et al. Validation of PNPLA3 polymorphisms as risk factor for NAFLD and liver fibrosis in an admixed population. Ann Hepatol. 2019;18(3):466-71.

49. Wagenknecht LE, Palmer ND, Bowden DW, Rotter JI, Norris JM, Ziegler J, et al. Association of PNPLA3 with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. Liver Int. 2011;31(3):412-6.

50. Chen LZ, Xin YN, Geng N, Jiang M, Zhang DD, Xuan SY. PNPLA3 I148M variant in nonalcoholic fatty liver disease: demographic and ethnic characteristics and the role of the variant in nonalcoholic fatty liver fibrosis. World J Gastroenterol. 2015;21(3):794-802.

51. Severson TJ, Besur S, Bonkovsky HL. Genetic factors that affect nonalcoholic fatty liver disease: A systematic clinical review. World J Gastroenterol. 2016;22(29):6742-56.

52. Wang CW, Lin HY, Shin SJ, Yu ML, Lin ZY, Dai CY, et al. The PNPLA3 I148M polymorphism is associated with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in a normoglycaemic population. Liver Int. 2011;31(9):1326-31.

53. Sevastianova K, Kotronen A, Gastaldelli A, Perttilä J, Hakkarainen A, Lundbom J, et al. Genetic variation in PNPLA3 (adiponutrin) confers sensitivity to weight loss-induced decrease in liver fat in humans. Am J Clin Nutr. 2011;94(1):104-11.

54. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2011;53(6):1883-94.

55. Speliotes EK, Butler JL, Palmer CD, Voight BF, Hirschhorn JN, Consortium G, et al. PNPLA3 variants specifically confer increased risk for histologic nonalcoholic fatty liver disease but not metabolic disease. Hepatology. 2010;52(3):904-12.

56. Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, et al. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. Diabetes. 2009;58(11):2616-23.

57. Nishioji K, Mochizuki N, Kobayashi M, Kamaguchi M, Sumida Y, Nishimura T, et al. The Impact of PNPLA3 rs738409 Genetic Polymorphism and Weight Gain ≥10 kg after Age 20 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Non-Obese Japanese Individuals. PLoS One. 2015;10(10):e0140427.

58. Petta S, Vanni E, Bugianesi E, Rosso C, Cabibi D, Cammà C, et al. PNPLA3 rs738409 I748M is associated with steatohepatitis in 434 non-obese subjects with hepatitis C. Aliment Pharmacol Ther. 2015;41(10):939-48.

59. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan HY, Yeung DK, Chan RS, et al. PNPLA3 gene polymorphism accounts for fatty liver in community subjects without metabolic syndrome. Aliment Pharmacol Ther. 2014;39(5):532-9.

60. Huang CF, Chen JJ, Yeh ML, Huang CI, Hsieh MY, Yang HL, et al. PNPLA3 genetic variants determine hepatic steatosis in non-obese chronic hepatitis C patients. Sci Rep. 2015;5:11901.

61. Stender S, Kozlitina J, Nordestgaard BG, Tybjærg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC. Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. Nat Genet. 2017;49(6):842-7.

62. Huang CF, Dai CY, Yeh ML, Huang CI, Tai CM, Hsieh MH, et al. Association of diabetes and PNPLA3 genetic variants with disease severity of patients with chronic hepatitis C virus infection. J Hepatol. 2015;62(3):512-8.

63. Shen J, Wong GL, Chan HL, Chan RS, Chan HY, Chu WC, et al. PNPLA3 gene polymorphism and response to lifestyle modification in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(1):139-46.

64. Wang JZ, Cao HX, Chen JN, Pan Q. PNPLA3 rs738409 underlies treatment response in nonalcoholic fatty liver disease. World J Clin Cases. 2018;6(8):167-75.

65. Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. Hepatology. 2011;54(1):60-9.

66. Cai T, Dufour JF, Muellhaupt B, Gerlach T, Heim M, Moradpour D, et al. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. J Hepatol. 2011;55(3):529-35.

67. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. Hepatology. 2011;53(3):791-9.

68. Kupcinskas J, Valantiene I, Varkalaitė G, Steponaitiene R, Skieceviciene J, Sumskiene J, et al. PNPLA3 and RNF7 Gene Variants are

Associated with the Risk of Developing Liver Fibrosis and Cirrhosis in an Eastern European Population. J Gastrointestin Liver Dis. 2017;26(1):37-43.

69. Crisan D, Grigorescu M, Crisan N, Craciun R, Lupsor M, Radu C, et al. Association between PNPLA3[G]/I148M variant, steatosis and fibrosis stage in hepatitis C virus - genetic matters. J Physiol Pharmacol. 2019;70(4).

70. Jiménez-Sousa M, Gómez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Sánchez-Ruano JJ, Fernández-Rodríguez A, Artaza-Varasa T, et al. PNPLA3 rs738409 polymorphism is associated with liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C: A repeated measures study. J Clin Virol. 2018;103:71-4.

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

72. Huang CM, Chang KC, Hung CH, Chiu KW, Lu SN, Wang JH, et al. Impact of PNPLA3 and IFNL3 polymorphisms on hepatic steatosis in Asian patients with chronic hepatitis C. PLoS One. 2017;12(8):e0182204.

73. Zampino R, Coppola N, Cirillo G, Boemio A, Pisaturo M, Marrone A, et al. Abdominal fat interacts with PNPLA3 I148M, but not with the APOC3 variant in the pathogenesis of liver steatosis in chronic hepatitis C. J Viral Hepat. 2013;20(8):517-23.

74. Manchiero C, Nunes AKDS, Magri MC, Dantas BP, Mazza CC, Barone AA, et al. The rs738409 polymorphism of the PNPLA3 gene is associated with hepatic steatosis and fibrosis in Brazilian patients with chronic hepatitis C. BMC Infect Dis. 2017;17(1):780.

75. Senkerikova R, Frankova S, Jirsa M, Kreidlova M, Merta D, Neroldova M, et al. PNPLA3 rs738409 G allele carriers with genotype 1b HCV cirrhosis

have lower viral load but develop liver failure at younger age. PLoS One. 2019;14(9):e0222609.

76. Mandorfer M, Scheiner B, Stättermayer AF, Schwabl P, Paternostro R, Bauer D, et al. Impact of patatin-like phospholipase domain containing 3 rs738409 G/G genotype on hepatic decompensation and mortality in patients with portal hypertension. Aliment Pharmacol Ther. 2018;48(4):451-9.

77. Dunn W, Vittal A, Zhao J, He J, Chakraborty S, Whitener M, et al. PNPLA3 gene predicts clinical recovery after sustained virological response in decompensated hepatitis C cirrhosis. BMJ Open Gastroenterol. 2019;6(1):e000241.

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

79. Stickel F, Buch S, Nischalke HD, Weiss KH, Gotthardt D, Fischer J, et al. Genetic variants in PNPLA3 and TM6SF2 predispose to the development of hepatocellular carcinoma in individuals with alcohol-related cirrhosis. Am J Gastroenterol. 2018.

80. Salameh H, Raff E, Erwin A, Seth D, Nischalke HD, Falleti E, et al. PNPLA3 Gene Polymorphism Is Associated With Predisposition to and Severity of Alcoholic Liver Disease. Am J Gastroenterol. 2015;110(6):846-56.

81. Ruhl CE, Menke A, Cowie CC, Everhart JE. Relationship of hepatitis C virus infection with diabetes in the U.S. population. Hepatology. 2014;60(4):1139-49.

82. Valenti L, Maggioni P, Piperno A, Rametta R, Pelucchi S, Mariani R, et al. Patatin-like phospholipase domain containing-3 gene I148M polymorphism,

steatosis, and liver damage in hereditary hemochromatosis. World J Gastroenterol. 2012;18(22):2813-20.

83. Friedrich K, Rupp C, Hov JR, Steinebrunner N, Weiss KH, Stiehl A, et al. A frequent PNPLA3 variant is a sex specific disease modifier in PSC patients with bile duct stenosis. PLoS One. 2013;8(3):e58734.

84. Stättermayer AF, Traussnigg S, Dienes HP, Aigner E, Stauber R, Lackner K, et al. Hepatic steatosis in Wilson disease - Role of copper and PNPLA3 mutations. J Hepatol. 2015;63(1):156-63.

85. Mahdessian H, Taxiarchis A, Popov S, Silveira A, Franco-Cereceda A, Hamsten A, et al. TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(24):8913-8.

86. Ehrhardt N, Doche ME, Chen S, Mao HZ, Walsh MT, Bedoya C, et al. Hepatic TM6SF2 overexpression affects cellular ApoB-trafficking, plasma lipid levels, hepatic steatosis and atherosclerosis. Hum Mol Genet. 2017;26(14):2719-31.

87. Buch S, Stickel F, Trépo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, et al. A genome-wide association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. Nat Genet. 2015;47(12):1443-8.

88. Prill S, Caddeo A, Baselli G, Jamialahmadi O, Dongiovanni P, Rametta R, et al. The TM6SF2 E167K genetic variant induces lipid biosynthesis and reduces apolipoprotein B secretion in human hepatic 3D spheroids. Sci Rep. 2019;9(1):11585.

89. Holmen OL, Zhang H, Fan Y, Hovelson DH, Schmidt EM, Zhou W, et al. Systematic evaluation of coding variation identifies a candidate causal

variant in TM6SF2 influencing total cholesterol and myocardial infarction risk. Nat Genet. 2014;46(4):345-51.

90. Milano M, Aghemo A, Mancina RM, Fischer J, Dongiovanni P, De Nicola S, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene E167K variant impacts on steatosis and liver damage in chronic hepatitis C patients. Hepatology. 2015;62(1):111-7.

91. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. J Hepatol. 2018;68(2):268-79.

92. Chen LZ, Xia HH, Xin YN, Lin ZH, Xuan SY. TM6SF2 E167K Variant, a Novel Genetic Susceptibility Variant, Contributing to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Clin Transl Hepatol. 2015;3(4):265-70.

93. Kahali B, Liu YL, Daly AK, Day CP, Anstee QM, Speliotes EK. TM6SF2: catch-22 in the fight against nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease? Gastroenterology. 2015;148(4):679-84.

94. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. Hepatology. 2015;61(2):506-14.

95. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JB, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Nat Commun. 2014;5:4309.

96. Goffredo M, Caprio S, Feldstein AE, D'Adamo E, Shaw MM, Pierpont B, et al. Role of TM6SF2 rs58542926 in the pathogenesis of nonalcoholic pediatric fatty liver disease: A multiethnic study. Hepatology. 2016;63(1):117-25.

97. Pirola CJ, Sookoian S. The dual and opposite role of the TM6SF2-rs58542926 variant in protecting against cardiovascular disease and conferring risk for nonalcoholic fatty liver: A meta-analysis. Hepatology. 2015;62(6):1742-56.

98. Coppola N, Rosa Z, Cirillo G, Stanzione M, Macera M, Boemio A, et al. TM6SF2 E167K variant is associated with severe steatosis in chronic hepatitis C, regardless of PNPLA3 polymorphism. Liver Int. 2015;35(8):1959-63.

99. Eslam M, Mangia A, Berg T, Chan HL, Irving WL, Dore GJ, et al. Diverse impacts of the rs58542926 E167K variant in TM6SF2 on viral and metabolic liver disease phenotypes. Hepatology. 2016;64(1):34-46.

100. Petta S, Maida M, Grimaudo S, Pipitone RM, Macaluso FS, Cabibi D, et al. TM6SF2 rs58542926 is not associated with steatosis and fibrosis in large cohort of patients with genotype 1 chronic hepatitis C. Liver Int. 2016;36(2):198-204.

101. Basyte-Bacevice V, Skieceviciene J, Valantiene I, Sumskiene J, Petrenkiene V, Kondrackiene J, et al. TM6SF2 *and* MBOAT7 *Gene Variants in Liver Fibrosis and Cirrhosis*. Int J Mol Sci. 2019;20(6).

102. Tamaki N, Kurosaki M, Higuchi M, Takada H, Nakakuki N, Yasui Y, et al. Genetic Polymorphisms of IL28B and PNPLA3 Are Predictive for HCV Related Rapid Fibrosis Progression and Identify Patients Who Require Urgent Antiviral Treatment with New Regimens. PLoS One. 2015;10(9):e0137351.

103. Rembeck K, Lagging M. Impact of IL28B, ITPA and PNPLA3 genetic variants on therapeutic outcome and progression of hepatitis C virus infection. Pharmacogenomics. 2015;16(10):1179-88.

104. Liu Z, Que S, Zhou L, Zheng S, Romeo S, Mardinoglu A, et al. The effect of the TM6SF2 E167K variant on liver steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a meta-analysis. Sci Rep. 2017;7(1):9273.

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

106. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28(7):412-9.

107. Vasques AC, Rosado LE, Cássia GAlfenas R, Geloneze B. Critical analysis on the use of the homeostasis model assessment (HOMA) indexes in the evaluation of the insulin resistance and the pancreatic beta cells functional capacity. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52(1):32-9.

108. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, National Heart Ln, and Blood Institute, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(2):e13-8.

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

110. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980;32(3):314-31.

111. Petta S, Cammà C, Di Marco V, Alessi N, Cabibi D, Caldarella R, et al. Insulin resistance and diabetes increase fibrosis in the liver of patients with genotype 1 HCV infection. Am J Gastroenterol. 2008;103(5):1136-44.

112. Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, et al. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: a meta-analysis of individual patient data. Gastroenterology. 2006;130(6):1636-42.

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

114. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. Gastroenterology. 2008;134(2):416-23.

115. Patel K, Thompson AJ, Chuang WL, Lee CM, Peng CY, Shanmuganathan G, et al. Insulin resistance is independently associated with significant hepatic fibrosis in Asian chronic hepatitis C genotype 2 or 3 patients. J Gastroenterol Hepatol. 2011;26(7):1182-8.

116. Li J ZT, Gordon SC et al. Impact of sustained virological response on the risk of type 2 diabetes among hepatites C patients in the US. J Viral Hepat. 2018;25 (8):952-58.

117. Hsu CS, Liu CJ, Liu CH, Wang CC, Chen CL, Lai MY, et al. High hepatitis C viral load is associated with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. Liver Int. 2008;28(2):271-7.

118. Mostafa A, Mohamed MK, Saeed M, Hasan A, Fontanet A, Godsland I, et al. Hepatitis C infection and clearance: impact on atherosclerosis and cardiometabolic risk factors. Gut. 2010;59(8):1135-40.

119. Shaheen M, Echeverry D, Oblad MG, Montoya MI, Teklehaimanot S, Akhtar AJ. Hepatitis C, metabolic syndrome, and inflammatory markers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [NHANES III]. Diabetes Res Clin Pract. 2007;75(3):320-6.

120. Romero-Gómez M, Fernández-Rodríguez CM, Andrade RJ, Diago M, Alonso S, Planas R, et al. Effect of sustained virological response to treatment on the incidence of abnormal glucose values in chronic hepatitis C. J Hepatol. 2008;48(5):721-7.

121. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2019. Disponível em: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf. Accessed nov 16, 2020.

122. Boyer A, Park SB, de Boer YS, Li Q, Liang TJ. TM6SF2 Promotes Lipidation and Secretion of Hepatitis C Virus in Infected Hepatocytes. Gastroenterology. 2018;155(6):1923-35.e8.

123. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. Clin Sci (Lond). 2004;106(3):261-8.

124. Yang L, Miura K, Zhang B, Matsushita H, Yang YM, Liang S, et al. TRIF Differentially Regulates Hepatic Steatosis and Inflammation/Fibrosis in Mice. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2017;3(3):469-83.

125. Zhou Y, Llauradó G, Orešič M, Hyötyläinen T, Orho-Melander M, Yki-Järvinen H. Circulating triacylglycerol signatures and insulin sensitivity in NAFLD associated with the E167K variant in TM6SF2. J Hepatol. 2015;62(3):657-63.

126. Viitasalo A, Pihlajamäki J, Paananen J, Atalay M, Lindi V, Lakka TA. Associations of TM6SF2 167K allele with liver enzymes and lipid profile in children: the PANIC Study. Pediatr Res. 2016;79(5):684-8.

127. Lallukka S, Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016;30(3):385-95.

128. Sookoian S, Castaño GO, Scian R, Mallardi P, Fernández Gianotti T, Burgueño AL, et al. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. Hepatology. 2015;61(2):515-25.

129. Chen X, Zhou P, De L, Li B, Su S. The roles of transmembrane 6 superfamily member 2 rs58542926 polymorphism in chronic liver disease: A meta-analysis of 24,147 subjects. Mol Genet Genomic Med. 2019;7(8):e824.

130. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. Hepatology. 2017;66(4):1111-24.

131. Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. Gastroenterology. 2008;134(6):1699-714.

132. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. Am J Hum Biol. 2010;22(2):187-92.

133. Machado CM, Leite NC, França PH, Cardoso CR, Salles GF, Villela-Nogueira CA. PNPLA3 gene polymorphism in Brazilian patients with type 2 diabetes: A prognostic marker beyond liver disease? Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2019;29(9):965-71.

134. Magri MC, Manchiero C, Prata TVG, Nunes AKDS, Oliveira Junior JS, Dantas BP, et al. The influence of gene-chronic hepatitis C virus infection on hepatic fibrosis and steatosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2020;97(2):115025.

135. Salameh H, Masadeh M, Al Hanayneh M, Petros V, Maslonka M, Nanda A, et al. PNPLA3 polymorphism increases risk for and severity of chronic hepatitis C liver disease. World J Hepatol. 2016;8(35):1584-92.

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

137. Xia MF, Ling Y, Bian H, Lin HD, Yan HM, Chang XX, et al. I148M variant of PNPLA3 increases the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease caused by obesity and metabolic disorders. Aliment Pharmacol Ther. 2016;43(5):631-42.

138. Del Ben M, Polimeni L, Brancorsini M, Di Costanzo A, D'Erasmo L, Baratta F, et al. Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and patatin-like phospholipase domain-containing protein3 gene variants. Eur J Intern Med. 2014;25(6):566-70.

139. Park JH, Cho B, Kwon H, Prilutsky D, Yun JM, Choi HC, et al. I148M variant in PNPLA3 reduces central adiposity and metabolic disease risks while increasing nonalcoholic fatty liver disease. Liver Int. 2015;35(12):2537-46.

140. Karamfilova V, Gateva A, Assyov Y, Alexiev A, Savov A, Yaneva N, et al. PNPLA3 I148M Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. J Gastrointestin Liver Dis. 2019;28(4):433-8.

141. Mangge H, Baumgartner BG, Zelzer S, Prüller F, Schnedl WJ, Reininghaus EZ, et al. Patatin-like phospholipase 3 (rs738409) gene polymorphism is associated with increased liver enzymes in obese adolescents and metabolic syndrome in all ages. Aliment Pharmacol Ther. 2015;42(1):99-105.

142. Cardoso AC, Perez RM, de Figueiredo-Mendes C, Carvalho Leite N, Moraes-Coelho HS, Villela-Nogueira CA. Prevalence and predictive factors of moderate/severe liver steatosis in chronic hepatitis C (CHC) infected patients evaluated with controlled attenuation parameter (CAP). J Viral Hepat. 2018.

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

144. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. J Hepatol. 2008;49(4):634-51.

145. Bugianesi E, Salamone F, Negro F. The interaction of metabolic factors with HCV infection: does it matter? J Hepatol. 2012;56 Suppl 1:S56-65.

146. Chang ML. Metabolic alterations and hepatitis C: From bench to bedside. World J Gastroenterol. 2016;22(4):1461-76.

147. van der Poorten D, Samer CF, Ramezani-Moghadam M, Coulter S, Kacevska M, Schrijnders D, et al. Hepatic fat loss in advanced nonalcoholic steatohepatitis: are alterations in serum adiponectin the cause? Hepatology. 2013;57(6):2180-8.

148. Zhao H, Song X, Li Z, Wang X. Risk factors associated with nonalcohol fatty liver disease and fibrosis among patients with type 2 diabetes mellitus. Medicine (Baltimore). 2018;97(37):e12356.

149. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2014;109(3):325-34.

150. Yang J, Trépo E, Nahon P, Cao Q, Moreno C, Letouzé E, et al. PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases. Int J Cancer. 2018.

151. Trépo E, Nahon P, Bontempi G, Valenti L, Falleti E, Nischalke HD, et al. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. Hepatology. 2014;59(6):2170-7.

152. Anstee QM, Liu YL, Day CP, Reeves HL. Reply to: HCC and liver disease risk in homozygous PNPLA3 p.I148M carriers approach monogenic inheritance. J Hepatol. 2015;62(4):982-3.

153. Zhang S, Wu H, Wu X, Lian W, Wang Y, Zhang X, et al. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma and its development in patients with cirrhosis: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med. 2015;8(5):6638-49.

154. Raksayot M, Chuaypen N, Khlaiphuengsin A, Pinjaroen N, Treeprasertsuk S, Poovorawan Y, et al. Independent and additive effects of PNPLA3 and TM6SF2 polymorphisms on the development of non-B, non-C hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol. 2019;54(5):427-36.

155. Yen YH, Tsai MC, Wu CK, Chang KC, Hung CH, Chiu KW, et al. Association between PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma in Asian chronic hepatitis C patients: A longitudinal study. J Formos Med Assoc. 2018;117(9):833-40.

156. Finkenstedt A, Auer C, Glodny B, Posch U, Steitzer H, Lanzer G, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 rs738409-G in recipients of liver transplants is a risk factor for graft steatosis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11(12):1667-72.

157. Liu ZT, Chen TC, Lu XX, Cheng J, Xie HY, Zhou L, et al. PNPLA3 I148M variant affects non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients. World J Gastroenterol. 2015;21(34):10054-6.

158. Miyaaki H, Miuma S, Taura N, Shibata H, Soyama A, Hidaka M, et al. PNPLA3 as a liver steatosis risk factor following living-donor liver transplantation for hepatitis C. Hepatol Res. 2018;48(3):E335-E9.